

Die Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 bei der molekularen Pathogenese des anaplastisch-großzelligen Lymphoms

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin



von

Dipl.-Biol. André Weilemann

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Uwe Ohler
2. Prof. Dr. Georg Lenz
3. Prof. Dr. Nils Blüthgen
4. Prof. Dr. Christine Sers
5. Prof. Dr. Thomas Eitinger

Datum der Disputation:

19. August 2016

I. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

André Weilemann

Berlin, den 01.12.2015

II. DANKSAGUNG

Der größte und natürlich erste Dank gilt meinem Betreuer und „Doktorvater“ Herrn Prof. Dr. Georg Lenz. Ohne seine uneingeschränkte Hilfe und seine Visionen wären diese Arbeit und die damit verknüpfte wissenschaftliche Veröffentlichung nicht möglich gewesen. Die Qualität der persönlichen Betreuung und der wissenschaftliche Fokus, auch in kniffligen Situationen, sind nur wenige Beispiele die dieses Projekt so erfolgreich gemacht haben.

Der zweite Dank gilt meinen Kollegen, die es täglich schaffen im stressigen Wissenschaftsbetrieb die Arbeitsatmosphäre im Büro und Labor professionell und trotzdem freundschaftlich zu halten. Danke für die vielen Diskussionen und eure Hilfe beim Erstellen der folgenden Daten und verfassen dieser Arbeit.

Vielen Dank an meine Promotionskommission. Allen voran Frau Prof. Dr. Sers und Herrn Prof. Dr. Blüthgen, die die folgende Arbeit begutachtet haben.

Ein großer Dank gehört meinen Freunden, die in den letzten Jahren so viel Verständnis und auch in schwierigen Phasen ein offenes Ohr für mich hatten.

Vielen Dank an meine Eltern, meinen Bruder und meine Schwester. Auch wenn uns manchmal Kilometer trennten, wart ihr die, die immer das Große und Ganze im Auge hatte, diejenigen, auf die man sich im Hintergrund verlassen konnte.

III. INHALTSVERZEICHNIS

I.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	2
II.	DANKSAGUNG	3
III.	INHALTSVERZEICHNIS	4
IV.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
V.	TABELLENVERZEICHNIS	9
VI.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
1	EINLEITUNG	12
1.1	Karzinogenese und Tumorwachstum.....	12
1.2	Maligne Lymphome	13
1.3	Periphere T-Zell-Lymphome	13
1.4	Anaplastisch-großzelliges Lymphom.....	16
1.4.1	Molekulare Pathogenese ALK-positiver ALCL	17
1.4.2	Molekulare Pathogenese ALK-negativer ALCL	21
1.5	Interferon-Regulationsfaktoren.....	22
1.5.1	Struktur und Funktion der Interferon- Regulationsfaktoren	22
1.5.2	Die Funktion des Interferon-Regulationsfaktors 4	25
1.5.3	Die Rolle von IRF4 bei der Pathogenese maligner Lymphome	28
1.6	Zielstellung der Arbeit.....	30
2	ERGEBNISSE	31
2.1	Bestimmung der IRF4-Expression bei primären ALCL-Patientenbiopsien	31
2.2	IRF4-Expression bei ALCL-Zelllinien.....	33
2.3	ALCLs sind von der Funktion von IRF4 abhängig	34

2.4	Untersuchung des durch IRF4 kontrollierten Genexpressionsnetzwerks	40
2.5	Herunterregulation von <i>IRF4</i> vermindert die Expression von MYC beim ALCL	42
2.6	MYC-Expression nach Herunterregulation von <i>IRF4</i> bei ALCL-Zelllinien	43
2.7	MYC-Expression ist essentiell für die Viabilität von ALCL-Zelllinien	46
2.8	IRF4/MYC-Signalweg als potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten...	52
3	DISKUSSION	54
3.1	IRF4 als Biomarker des anaplastisch-großzelligen Lymphoms	54
3.2	IRF4 als Achillesferse des ALCL.....	56
3.3	Molekularbiologische Grundlage der Abhängigkeit von IRF4 beim ALCL	59
3.4	MYC als potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten.....	62
3.5	Perspektive.....	65
4	MATERIAL UND METHODEN	66
4.1	Materialien	66
4.2	Geräte.....	68
4.3	Kits	69
4.4	Puffer.....	70
4.5	Immunhistochemische Färbung von IRF4	71
4.6	Humane Zelllinien und Zellkulturmedien	71
4.7	Retrovirale Vektoren.....	72
4.8	Amplifikation retroviraler Vektoren	74
4.9	Analyse von Nukleinsäuren.....	75
4.9.1	Extraktion amplifizierter Plasmid-DNA.....	75
4.9.2	Extraktion eukaryotischer RNA.....	75
4.9.3	Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung von Plasmid-DNA	75
4.9.4	Amplifikation und Klonierung von cDNA.....	76
4.9.5	Klonierung von shRNAs.....	77

4.10	Retrovirale Transduktion humaner Zelllinien	78
4.10.1	Transfektion von 293T/CeB-Zellen	78
4.10.2	Transduktion humaner Zelllinien	79
4.10.3	Expression von shRNAs und cDNA in humanen Zelllinien	80
4.11	Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen	81
4.12	Xenograft-Mausmodell	82
4.13	Chromatin-Immunpräzipitation	82
4.14	Proteinnachweis mittels Immuno-Blot	84
4.14.1	Proteinextraktion	84
4.14.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	84
4.14.3	Immuno-Blot	85
4.14.4	Proteindetektion	85
4.15	Quantitative RT-PCR	86
4.16	Viabilitätsmessung	86
4.17	Genexpressionsanalyse	87
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	SUMMARY	90
7	REFERENZEN	91
8	ANHANG	104

IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Verteilung der PTCL-Subtypen	15
Abbildung 2: NPM-ALK Aktivierung und nachgeschaltete Signalwege.....	20
Abbildung 3: Struktur und Lokalisation der Interferon-Regulationsfaktoren.....	24
Abbildung 4: Die Rolle von IRF4 bei der Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen	27
Abbildung 5: Immunhistochemische Bestimmung von IRF4 bei primären ALCL-Patientenproben.	31
Abbildung 6: Inzidenz der IRF4-Expression bei primären ALCL-Patientenproben	32
Abbildung 7: Analyse der <i>IRF4</i> -mRNA-Expression bei ALCL-Zelllinien	33
Abbildung 8: Analyse der IRF4-Proteinexpression bei ALCL-Zelllinien	34
Abbildung 9: shRNA-vermittelte Herunterregulation von <i>IRF4</i> auf RNA-Ebene.	35
Abbildung 10: shRNA-vermittelte Herunterregulation von IRF4 auf Proteinebene	35
Abbildung 11: ALCL-Zelllinien sind abhängig von der <i>IRF4</i> -Expression.....	37
Abbildung 12: Die Expression der <i>IRF4</i> -cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen <i>IRF4</i>	38
Abbildung 13: Herunterregulation von <i>IRF4</i> bei ALCL-Xenograft-Mausmodellen	39
Abbildung 14: IRF4-kontrollierte Genexpressionsnetzwerke	41
Abbildung 15: Herunterregulation von IRF4 induziert eine Herunterregulation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors MYC	42
Abbildung 16: shRNA-vermittelte Herunterregulation von <i>IRF4</i> führt zu einer Herunterregulation von <i>MYC</i>	43
Abbildung 17: shRNA-vermittelte Herunterregulation von IRF4 führt zu einer Herunterregulation von MYC auf Proteinebene	44
Abbildung 18: IRF4 bindet im <i>MYC</i> -Promotor bei ALCL-Zelllinien.....	45
Abbildung 19: NPM-ALK reguliert IRF4 und MYC bei ALK-positiven ALCLs	46
Abbildung 20: MYC-Expression bei ALCL-Patientenproben und Zelllinien	48
Abbildung 21: shRNA-vermittelte Herunterregulation von MYC auf Proteinebene.....	49
Abbildung 22: ALCL-Zelllinien sind abhängig von der <i>MYC</i> -Expression	50
Abbildung 23: Die Expression der <i>MYC</i> -cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen <i>MYC</i>	50
Abbildung 24: Die Expression der <i>MYC</i> -cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen <i>IRF4</i> bei der ALCL-Zelllinien DEL.	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 25: MYC-Inhibierung bei ALCL-Zelllinien	53
Abbildung 26: Ursachen der IRF4-Expression beim ALCL	58
Abbildung 27: Retrovirale Expressionsvektoren zur Expression von shRNA- und cDNA-Konstrukten	74

V. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Humane Zelllinien und Zellkulturmedien	72
Tabelle 2: Amplifikationsprimer zur Klonierung der <i>IRF4</i> -cDNA	76
Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung der <i>IRF4</i> -cDNA	77
Tabelle 4: Zielsequenzen der verwendeten shRNAs	78
Tabelle 5: Chromatin-Immunpräzipitation <i>Real-Time</i> -PCR Primer	84
Tabelle 6: Signifikant deregulierte Gene nach <i>IRF4</i> Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien	104
Tabelle 7: Signifikant deregulierte Gensignaturen nach <i>IRF4</i> Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien	111
Tabelle 8: Signifikant deregulierte Gensignaturen nach <i>IRF4</i> Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien aus <i>Molecular Signatures Database</i>	112

VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
ABC-DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ
AICE	AP-1-IRF4-Element
AITL	<i>Angioimmunoblastic T-cell lymphoma</i>
ALCL	Anaplastisch-großzelliges Lymphom
ALK	Anaplastische-Lymphom-Kinase
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BATF	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>
bp	Basenpaare
BRD	Bromodomäne
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	Cyclin-abhängigen Kinase
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Fetal Bovine Serum
FDR	<i>False-Discovery-Rate</i>
FLAG	DYKDDDDK-Epitop
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GESA	<i>Gene Set Enrichment-Analyse</i>
GFP	Grün-fluoreszierendes-Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	<i>High Fidelity</i>
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase
HTLV-1	Humane T-lymphotropen-Virus 1
IAD	IRF-assozierte-Domäne
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>

IRF	Interferon-Regulationsfaktor
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
JAK	Januskinasen
LB	Luria/Broth
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MM	Multiples Myelom
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSCV	Maus-Stammzellen-Virus
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NPM	Nucleophosmin
NSG	<i>NOD scid gamma</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKG	Phosphoglyceratkinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTCL	Periphere T-Zell-Lymphome
PTCL-NOS	Nicht weiter klassifizierte PTCLs
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT-PCR	<i>Real Time-PCR</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SS	Sézary-Syndrom
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T-ALL	Akute lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-homologe-Domäne
TLR	Toll-ähnlichen-Rezeptoren
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UTR	<i>Untranslated region</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 EINLEITUNG

1.1 Karzinogenese und Tumorwachstum

Innerhalb eines lebenden Organismus ist die Kontrolle des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung. Deregulierungen von Kontrollmechanismen durch Mutationen in den Genen essentieller Proteine oder Amplifikationen spezifischer chromosomaler Regionen können zu unkontrolliertem Zellwachstum und zur Ausbildung einer Neoplasie führen.¹

Hierbei werden zwei verschiedene Formen neoplastischer Zellen unterschieden. Führt die deregulierte Zellteilung zur Bildung von Tumorgewebe, welches langsam proliferiert und ausschließlich umliegendes Gewebe verdrängt, aber nicht in dieses hineinwächst und nicht metastasiert, spricht man von einem benignen Tumor. Bei bösartigen (malignen) Neoplasien hingegen ist invasives Wachstum ein charakteristisches Merkmal. Zusätzlich kann es einzelnen Tumorzellen möglich sein, sich von der Hauptmasse zu lösen, in das Blut oder die Lymphgefäße zu gelangen und in anderen Regionen des Körpers sekundäre Tumore (Metastasen) zu bilden.²

Bei der Klassifizierung von Tumoren orientiert man sich am Zelltyp der Ursprungszelle bzw. des Ursprungsgewebes. Hierbei bilden die größte Gruppe Neoplasien der Epithelzellen, die zusammenfassend Karzinome genannt werden. Bildet hingegen mesenchymales Gewebe den Ursprung einer Neoplasie, spricht man von Sarkomen. Maligne hämatologische Erkrankungen können unter anderem Leukämien oder maligne Lymphome darstellen.²

1.2 Maligne Lymphome

Die Differenzierung und Entwicklung von B- und T-Zellen ist eng verknüpft mit Genumlagerungen und induzierten Mutationen, um die Variabilität von Antikörpern oder Antigenrezeptoren zu gewährleisten. Diese intrachromosomalen Vorgänge unterliegen einer strengen Kontrolle, deren Deregulation zur Bildung maligner Lymphome beitragen kann.²

Die erste wissenschaftliche Beschreibung eines malignen Lymphoms gelang 1832 dem Pathologen Thomas Hodgkin mit der Entdeckung des anschließend nach ihm benannten Hodgkin-Lymphoms (HL).³ Die technischen Entwicklungen der letzten Jahrzehnte führten zur Identifikation und Charakterisierung vieler weiterer Neoplasien des blutbildenden Systems.

Maligne Lymphome sind eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen, die von B-Zellen und T-Zellen unterschiedlicher Reifungs- und Differenzierungsstufen abstammen.⁴⁻⁶ Die Akquirierung von Mutationen, Deletionen, Translokationen und Amplifikationen verschiedener Gene kann die normale Zellentwicklung unterbrechen und die Zellproliferation steigern, sowie apoptotische Kontrollmechanismen verhindern.⁷ Verschiedene molekulargenetische Studien verweisen auf eine Vielzahl deregulierter zellulärer Prozesse und Signalwege, die zur Pathogenese maligner Lymphome beitragen.

1.3 Periphere T-Zell-Lymphome

Die grobe Gliederung maligner Lymphome in einen B- oder T-Zell-Ursprung reicht bei weitem nicht mehr aus um alle unterschiedlichen klinischen und histologischen Erscheinungsformen zu benennen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte gelang es durch

die Verbesserung diagnostischer Methoden verschiedene Subtypen genauer einzugrenzen und zu bestimmen. Hiermit wird gewährleistet, dass eine individuelle Behandlung des Patienten größtmöglichen Therapieerfolg garantiert.

Periphere T-Zell-Lymphome (*Peripheral T-cell lymphoma*, PTCL) stellen eine heterogene Untergruppe der T-Zell-Lymphome mit einer teilweise schlechten Prognose und einer Fünfjahresüberlebensrate von 32 - 70% dar.^{8,9} Die Klassifizierung der PTCL wurde 2008 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) neu überarbeitet.¹⁰ Als Ursprungszellen gelten in den meisten Fällen reife T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen).¹¹

In westlichen Ländern werden 5 - 10% aller Lymphome als PTCL diagnostiziert.^{12,13} In asiatischen Ländern hingegen tritt das PTCL wesentlich häufiger auf. Hier entspricht der Anteil an allen diagnostizierten malignen Lymphomen bis zu 20%.^{8,14} Hierfür wird zum einen der in Asien relativ geringe Anteil an „westlichen“ B-Zell-Lymphomen, wie z.B. dem follikulären Lymphom, als auch die in Asien stärkere Verbreitung des humanen T-lymphotropen-Virus 1 (HTLV-1) und des Epstein-Barr-Virus (EBV) vermutet.¹⁵

Den häufigsten Subtyp der peripheren T-Zell-Lymphome bilden die nicht weiter klassifizierbaren PTCLs (*PTCL-not otherwise specified*, PTCL-NOS; Abbildung 1).⁸ Hierbei handelt es sich um eine heterogene diagnostische Gruppe mit einem großen histologischen Spektrum, wobei bei den meisten Fällen die Expression der T-Zell-Antigene CD2, CD3 oder CD7 fehlt. Das mediane Erkrankungsalter der PTCL-NOS-Patienten liegt zwischen 55 und 60 Jahren und die Fünfjahresüberlebensrate liegt bei ca. 30%.^{16,17}

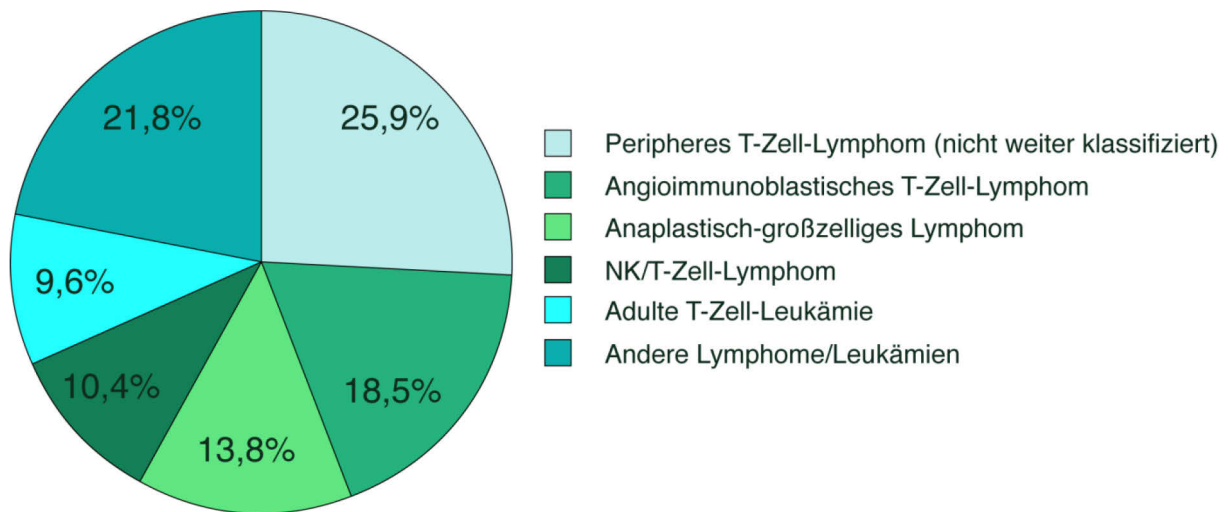


Abbildung 1: Verteilung der PTCL-Subtypen. Verteilung der sechs häufigsten PTCL-Subtypen bei einer Studie mit 1314 PTCL-Patienten.⁸

Bei dem zweithäufigsten Subtyp handelt es sich um das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom (*Angioimmunoblastic T-cell lymphoma*, AITL), das ca. 18,5% aller PTCLs ausmacht.⁸ Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass Zellen des AITL ihren Ursprung in follikulären T-Helferzellen haben.¹⁸ Zusätzlich ist bei Patienten des AITL eine starke Expansion monoklonaler B-Zell-Populationen zu erkennen, die außerdem mit dem Epstein-Barr-Virus infiziert sind.¹⁹ Wie beim PTCL-NOS betrifft auch dieses Lymphom eher ältere Patienten und hat eine Fünfjahresüberlebensrate von ebenfalls nur 30%.²⁰

Mit 13,8% bildet das anaplastisch-großzellige Lymphom (*Anaplastic large cell lymphoma*, ALCL) den dritthäufigsten Subtyp der peripheren T-Zell-Lymphome.⁸ Auf die Entdeckung, den zellulären Ursprung sowie die speziellen molekularen und klinischen Eigenschaften des ALCL soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.4 Anaplastisch-großzelliges Lymphom

Seit der Erstbeschreibung vor dreißig Jahren hat sich das Verständnis der molekularen Pathogenese des anaplastisch-großzelligen Lymphoms signifikant verbessert. Die großen lymphatischen Zellen und die starke extrazelluläre Expression des Zytokinrezeptors CD30 waren bereits bei seiner Entdeckung charakteristische Merkmale.²¹⁻²³ Gleichzeitig war diese neue Neoplasie sehr heterogen in Bezug auf Zytologie und Antigenpräsentation, weshalb sie häufig und fälschlicher Weise als Hodgkin-Lymphom diagnostiziert und in den späten achtziger Jahren eine entitätenüberschneidende Klassifizierung mit dem Namen Hodgkin-ähnliches anaplastisch-großzelliges Lymphom eingeführt wurde.²⁴ Später konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine tumorzellreiche Form des klassischen Hodgkin-Lymphoms handelte.²⁵

Zu dieser Zeit wurden ALCL in zwei Kategorien unterteilt, die primär die Lokalisation der eigentlichen Neoplasie beschrieben. Hierbei wurden systemische ALCLs, die extrakutan an Lymphknoten oder anderen Geweben auftreten, von kutanen ALCLs differenziert. Neben den unterschiedlichen Lokalisationen unterschieden sich die beiden Entitäten sowohl phänotypisch als auch klinisch.^{26,27}

Heute wird das anaplastisch-großzellige Lymphom in der Tumordiagnostik in drei verschiedene Subgruppen kategorisiert. Hierfür war die Entdeckung eines weiteren Tumormarkers, Ende der achtziger Jahre, von entscheidender Bedeutung: die Beschreibung einer Translokation zwischen den Chromosomen zwei und fünf.²⁸ Einige Jahre später legte die Entdeckung der an dieser Translokation beteiligten Gene *NPM* (Nucleophosmin) und *ALK* (Anaplastische-Lymphom-Kinase) den

Grundstein für die bis dato offizielle Einteilung der Weltgesundheitsorganisation in folgende Entitäten:

- primär systemisches ALK-positives anaplastisch-großzelliges Lymphom
- primär systemisches ALK-negatives anaplastisch-großzelliges Lymphom
- primär kutanes anaplastisch-großzelliges Lymphom

Neben *NPM* gibt es noch einige weitere, aber weniger häufig auftretende Translokationspartner des *ALK*-Gens, auf die später im Detail eingegangen wird.

Eine klassische Vorläuferzelle des ALCL konnte bisher nicht beschrieben werden. Neben der Expression von CD30 und verschiedener ALK-Translokationen wurden ALCLs im Rahmen verschiedener Studien auf weitere B-Zell- und T-Zellmarker untersucht. Bei diesen Studien zeigte sich, dass ALCLs die T-Zell-Antigene CD4 und CD8 extrazellulär exprimieren. Am häufigsten konnte jedoch die Präsentation der ϵ -Kette des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes nachgewiesen werden, wobei gleichzeitig einige wenige Lymphome keine Expression dieser Marker zeigten.^{22,29,30} Der T-Zell-Ursprung bestätigt sich bei genauer Untersuchung der Gene der γ - bzw. β -Kette des T-Zell-Rezeptors. Diese weisen in den meisten Fällen des anaplastisch-großzelligen Lymphoms eine genetische Umlagerung auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine Perforin und Granzym B exprimiert werden, die ansonsten mit zytotoxischen T-Zellen assoziiert sind.^{29,31,32}

1.4.1 Molekulare Pathogenese ALK-positiver ALCL

Das entscheidende Kennzeichen eines ALK-positiven ALCL ist die Expression eines Fusionsproteins, das zu einem Teil aus der Anaplastischen-Lymphom-Kinase besteht. Bei 75 - 80% der beschriebenen Fälle ist der Fusionspartner *NPM*. Bei der t(2;5)(p23;q35) Translokation fusioniert der N-Terminus des *NPM*-Proteins

(Aminosäuren 1-117) mit dem C-Terminus des ALK-Proteins.^{33,34} Dies führt dazu, dass die Expression des ALK-Proteins über den NPM-Promotor reguliert wird, was in einer konstitutiven Expression des Fusionsproteins resultiert, da physiologisches NPM als Protein-Carrier fungiert und im Kern jeder menschlichen Zelle exprimiert wird.³⁵⁻³⁷ Der N-Terminus des NPM-Proteins enthält die Oligomerisierungsdomäne, was dem Fusionsprotein ermöglicht sowohl mit sich selbst, als auch mit dem Wildtyp des NPM-Proteins zu oligomerisieren. Da sich im C-Terminus des NPM-Proteins zwei Kernlokalisierungssignale befinden, führt die Bildung eines Heterodimers aus Fusionsprotein und NPM Wildtyp zum Transport des Fusionsproteins in den Zellkern.^{38,39} Beim anaplastisch-großzelligen Lymphom ist dies ausschließlich bei der NPM-ALK Translokation zu beobachten.^{40,41}

Im Gegensatz zu Nucleophosmin wird die Anaplastische-Lymphom-Kinase in humanem Gewebe selten exprimiert. Dieser Transmembranrezeptor ist fast ausschließlich bei einigen Zellen des Zentralnervensystems zu finden.⁴² ALK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase vom Insulinrezeptor-Typ. Im C-Terminus, der in jedem ALK-Fusionsprotein zu finden ist, befindet sich die katalytische Domäne. Die Kinaseaktivität wird über die Oligomerisierung des Rezeptors aktiviert.^{34,39,43} Das Zusammenspiel der Oligomerisierungsdomäne des NPM-Proteins und die Aktivität der Anaplastischen-Lymphom-Kinase sind entscheidende Faktoren bei der molekularen Pathogenese des ALK-positiven ALCL.⁴⁴

Neben der Fusion mit Nucleophosmin treten bei 15 - 20% ALK-positiver ALCL-Patientenproben ALK-Fusionen mit weiteren Proteinen auf, die aber aufgrund ihrer Seltenheit ungenau charakterisiert sind. Interessanterweise ist bei diesen Neoplasien durch das Fehlen der NPM-Interaktion das ALK-Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma zu finden.⁴⁵ Der zweithäufigste Fusionspartner neben NPM ist der N-

Terminus des Proteins TPM3 welcher über die Translokation t(1;2)(q25;p23) zustande kommt.^{41,43,46} Genexpressionsanalysen konnten zeigen, dass Deregulationen bei der Zellzyklusregulation, Apoptose und Proliferation sowohl bei ALCL-Patienten mit NPM-ALK als auch mit TPM3-ALK-Translokation gefunden werden konnten.⁴⁶

Als Rezeptor-Tyrosinkinase vom Insulinrezeptor-Typ ist aktiviertes ALK an der Aktivierung vieler onkogener Signalwege beteiligt (Abbildung 2). Diese haben direkten Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Lymphomzellen. Die AKT-abhängige Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs führt bei den Tumorzellen des anaplastisch-großzelligen Lymphoms zur gesteigerten Proliferation.^{35,47} Hier wirkt NPM-ALK als Kopplungsstelle für Ras/ERK-aktivierende Proteine, die an die autophosphorylierten Tyrosinreste am C-terminalen ALK des Fusionsproteins binden.^{35,48} Diese Proteine aktivieren Signalkaskaden in deren Folge die Proteine ERK1 und ERK2 phosphoryliert werden.^{47,49} Dies resultiert u. a. in einer Stimulierung der Translation und Zellzyklusprogression durch die Aktivierung des nachgeschalteten mTOR-Signalwegs.^{48,50} Das Überleben der Tumorzellen und die Vermeidung des apoptotischen Zelltods werden über die ALK-vermittelte Aktivierung des JAK/STAT- und des PI3K/AKT-Signalwegs reguliert. Eine entscheidende Rolle im JAK/STAT-Signalweg spielt die Expression des Transkriptionsfaktors STAT3, dessen Aktivität bei ALK-positiven ALCL bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht wurde.^{51,52} Die Aktivierung von STAT3 erfolgt hier direkt über die Kinasefunktion des Fusionsproteins, kann aber auch über eine vorgeschaltete Aktivierung von JAK3 erfolgen.^{53,54} Die Expression von BCL-XL, Survivin oder MCL1, die als antiapoptotische Faktoren und Proteine der Zellzyklusregulation bekannt sind, wird in Folge dessen stimuliert.^{52,55,56}

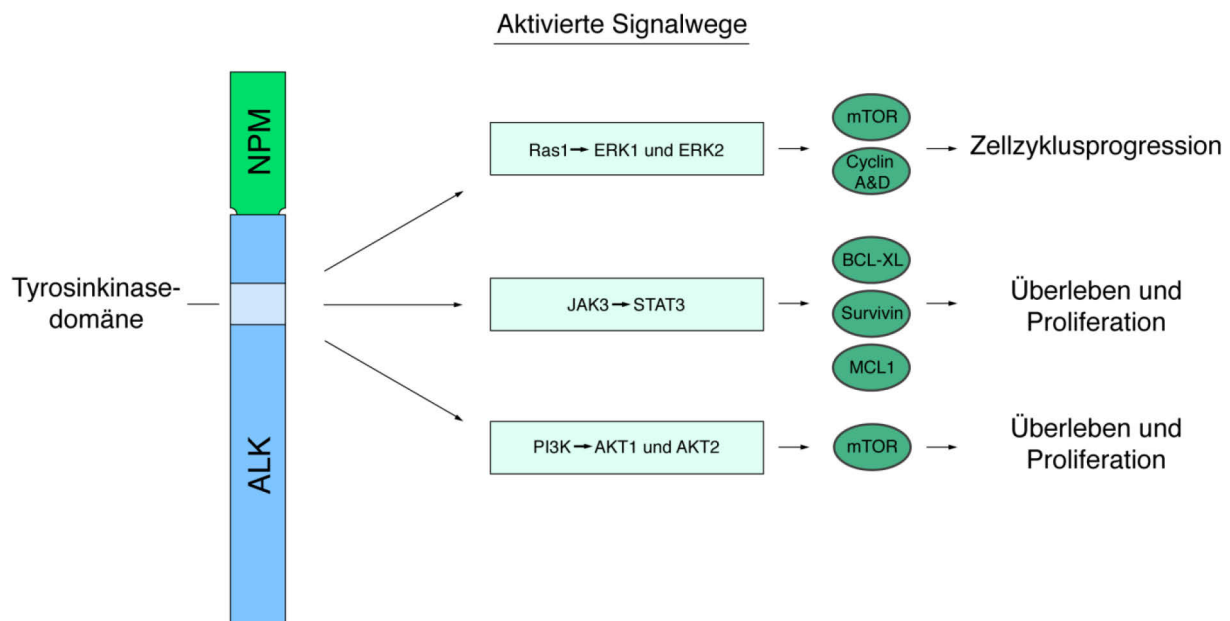


Abbildung 2: NPM-ALK Aktivierung und nachgeschaltete Signalwege. Die konstitutive Aktivierung der ALK-Tyrosinkinasedomäne führt über die Aktivierung des Ras/ERK-, des JAK/STAT- und des PI3K/AKT-Signalwegs zu Zellproliferation, Überleben und Zellzyklusprogression.

Neben dem JAK/STAT-Signalweg bindet und aktiviert NPM-ALK ebenfalls direkt das Protein PI3K. Hierdurch findet eine Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade statt, die unter anderem entscheidend an der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation über die Aktivierung des mTOR-Signalwegs beteiligt und bei vielen onkologischen Entitäten dereguliert ist.⁵⁷⁻⁵⁹

Ein besseres Verständnis der verschiedenen onkogenen Signalwege birgt die Möglichkeit für die Entwicklung von Inhibitoren, die klinisch bei der Behandlung ALK-positiver ALCL-Patienten angewendet werden könnten. Eine Inhibierung des Ras/ERK- bzw. des mTOR-Signalwegs zeigte *in vitro*, über die Induktion von Apoptose bereits erste vielversprechende Ergebnisse.^{50,60-62} Gleichzeitig führt die Inhibierung des JAK/STAT- und des PI3K/AKT-Signalwegs bei ALCL-Zelllinien zu einer Hemmung der Proliferation, so dass hier über mehrere Wege ein potentieller therapeutischer Ansatz verfolgt werden kann.^{54,57,63,64}

Zusätzlich zeigen neueste klinische Studien mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib (PF-2341066) erste erfolgsversprechende Ergebnisse bei ALK-positiven ALCL-Patienten.⁶⁵⁻⁶⁷

1.4.2 Molekulare Pathogenese ALK-negativer ALCL

Während ALK-positive ALCLs vermehrt in den ersten drei Lebensdekaden diagnostiziert werden, ist der Großteil der ALK-negativen ALCL-Patienten zwischen 55 und 70 Jahren alt.⁶⁸⁻⁷¹ Die molekulare Pathogenese ALK-negativer ALCL ist im Vergleich zu ALK-positiven ALCL noch unzulänglich verstanden.

Neueste Studien veranschaulichen einen starken Einfluss des NF-κB-Signalwegs bei der Pathogenese beider ALCL-Subtypen, unabhängig des ALK-Status.⁷² So konnte gezeigt werden, dass der ALCL-assoziierte Zytokinrezeptor CD30 maßgeblich an der Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs über die Expressionsstimulation der Transkriptionsfaktoren RelB und p52 beteiligt ist. Diese Aktivierung resultiert unter anderem in der Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors MYC und führt zur Steigerung der Proliferation der Tumorzellen.⁷²

Eine weitere Studie identifizierte in einer großen Untersuchung ALK-negativer Patientenproben mehrere genetische Veränderungen, die Rückschlüsse auf die zugrundeliegende molekulare Pathogenese geben könnten.⁷³ Es konnten somatische Mutationen, Kopiezahl-Veränderungen und bisher unbekannte Fusionsproteine identifiziert werden, die, wie auch beim ALK-positiven ALCL, zu einer konstitutiven Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs führten. Die Inhibierung dieser Aktivität führte in einem *in vivo*-Modell zu einer Hemmung des Tumorwachstums und zeigt eine neue Strategie zur Behandlung des ALK-negativen ALCL. Daten verschiedener Genexpressionsanalysen verweisen auf wenige Gene,

die bei ALK-negativen ALCL besonders hoch exprimiert werden, geben jedoch keinen Hinweis auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des Subtyps.⁷⁴⁻⁷⁶

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer intensiver Forschung, um insbesondere die Pathogenese ALK-negativer ALCL besser verstehen zu können.

1.5 Interferon-Regulationsfaktoren

In der Immunologie vereint man unter dem Begriff der Wirtsabwehr oder *host defense* zwei elementare Funktionen. Zum einen die Verteidigung gegen pathogene Organismen und zum anderen die Suppression der Tumorentstehung. Teil dieser komplexen zellulären Prozesse und der damit einhergehenden Expressionsregulation essentieller Signalwege, sind die Mitglieder der Interferon-Regulationsfaktoren (IRF) Familie. Die Entdeckung der ersten beiden, der nunmehr neun bekannten IRFs erfolgte 1988.⁷⁷⁻⁸⁰ Zu Beginn assoziierte man die Transkriptionsfaktoren ausschließlich mit der Vermittlung der Resistenz gegen virale Infektionen und mit der damit einhergehenden Transkriptionsregulation des Typ-I-Interferons beta (IFN β). Heute ist bekannt, dass neben IFN β viele weitere Zytokine und Chemokine der IRF-Regulation unterliegen und dass IRFs neben der Pathogenantwort auch die Regulation der Hämatopoese und den Zellzyklus entscheidend steuern.⁸¹⁻⁸³

1.5.1 Struktur und Funktion der Interferon-Regulationsfaktoren

Die Struktur der verschiedenen Interferon-Regulationsfaktoren weist in mehreren Bereichen des Proteins Homologien auf (Abbildung 3). Hierbei ist ein besonders konserviertes Motiv innerhalb der ersten 115 Aminosäuren zu finden. Die dort

lokalisierte DNA-Bindungsdomäne (DBD) der Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf einzelnen Tryptophanresten, die von 10 - 18 weiteren Aminosäuren voneinander getrennt sind. Dieses Helix-Turn-Helix-Motiv vermittelt in erster Linie die Bindung an das Interferon-stimulierte-Antwort-Element (*Interferon stimulated response element*, ISRE) mit der Kernsequenz 5'-GAAA-3'.⁸⁴⁻⁸⁶ Bis auf den Interferon-Regulationsfaktor 6 ist bei allen anderen IRFs im C-Terminus des Proteins eine IRF-assoziierte-Domäne (IAD) zu finden, die für die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren notwendig ist. Hierbei sind prinzipiell zwei verschiedene Formen der IAD zu unterscheiden. Das zentrale Motiv der in den IRF1 und IRF2 anzufindenden IAD2 ist eine *PEST-Sequenz*, welche die vier namensgebenden Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) enthält. Die IAD1 ist bei den restlichen Interferon-Regulationsfaktoren zu finden und besteht aus ca. 180 konservierten Aminosäuren.⁸⁷

Neben einer klassischen Expressionsregulation lässt sich die Aktivität einzelner IRFs auch über Regulations-Domänen posttranslational steuern. So kann z.B. über die Interaktion mit unterschiedlichen Bindungspartnern die Aktivität der IRFs 2, 3, 4, 5 und 7 von Gen-reprimierend zu Gen-aktivierend geändert werden. Zusätzlich besteht bei den IRFs 1, 3, 5 und 7 über die Proteinphosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Aktivität.⁸⁸





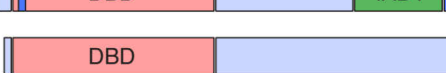
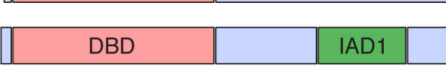
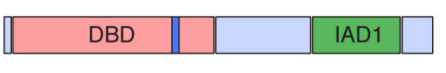


		Aminosäuren	Chromosomale Lokalisation
IRF1	N-  -C	325	5q31.1
IRF2		349	4q41.1-q35.1
IRF3		427	19q13.3-q13.4
IRF4		451	6p25-p23
IRF5		539	7q32
IRF6		467	1q32.3-q41
IRF7		516	11p15.5
IRF8		393	16.q24.1
IRF9		426	14q11.2

Abbildung 3: Struktur und Lokalisation der Interferon-Regulationsfaktoren. Alle Interferon-Regulationsfaktoren besitzen eine DNA-Bindungsdomäne (DBD; rot), die fünf charakteristische Tryptophanreste besitzt. Zusätzlich lässt sich bei fast allen IRFs eine von zwei verschiedenen IRF-assoziierten-Domänen (IAD; grün) finden. Die Interferon-Regulationsfaktoren 1, 3, 5 und 7 lassen sich über eine Phosphorylierung regulieren. Weitere Regulationselemente (gelb) und das Kernlokalisierungssignal (dunkelblau) sind für jedes IRF dargestellt. Außerdem ist die Anzahl der proteinbildenden Aminosäuren und die Lokalisation im humanen Genom gezeigt.

Die ersten Untersuchungen der IRF-Funktion beschränkten sich auf die Betrachtung der Wirkung in der Signalkaskade der angeborenen Immunantwort. Hier erkennen spezielle extra- bzw. intrazelluläre Rezeptoren, so genannte *Pattern Recognition Receptors* (PRR), verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster, wie virale einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren oder Lipopolysaccharide.⁸⁹ Aktivierte, zytosolische PRRs signalisieren in den meisten Fällen über die IRFs 3, 5 und 7, was primär in der Expression von proinflammatorischen Zytokinen bzw. Typ-I-Interferonen resultiert.⁸⁹⁻⁹¹ Den größten Anteil der extrazellulären PRR stellt die Proteinfamilie der Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*toll-like receptor*, TLR) dar, von denen bisher zehn im Menschen identifiziert wurden. Alle TLRs besitzen eine intrazelluläre Toll/IL-1-Rezeptor-homologe-Domäne (*Toll/interleukin-1 receptor*, TIR), die für die Weiterleitung und Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden unabdingbar ist. Zu den

erste Proteinen, die diese Signale im Zytoplasma erhalten und weiterleiten gehören, abhängig vom aktivierten TLR, die IRFs 1, 3, 5, 7 und 8. Wie auch bei der Aktivierung zytosolischer PRRs, resultiert die Signalkaskade in den meisten Fällen in einer Expressionssteigerung verschiedener Zytokine und Typ I-Interferone.⁹²⁻⁹⁴

In den letzten Jahren konnte am Beispiel des Humanen Herpesvirus Typ 8 und des Hepatitis-C-Virus gezeigt werden, dass diese über die Expression IRF-ähnlicher Proteinstrukturen verfügen und damit in die durch IRF-vermittelte Pathogenabwehr eingreifen. Diese vIRF genannten Proteine haben strukturelle Ähnlichkeit mit dem typischen IRF N-Terminus und der damit assoziierten DBD, jedoch ohne die für die DNA-Bindung essentiellen fünf Tryptophanreste. Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus der vIRF noch nicht vollständig bekannt ist, wird vermutet, dass durch die strukturelle Ähnlichkeit eine Repression des eigentlich aktivierten Signalwegs erzielt wird.⁹⁵⁻⁹⁷

1.5.2 Die Funktion des Interferon-Regulationsfaktors 4

Entdeckt wurde der Transkriptionsfaktor IRF4 im Jahr 1995 als Interaktionspartner von PU.1 in einem regulatorischen Element der leichten Kette des B-Zell-Rezeptors.⁹⁸ Gleichzeitig ist die Expression von IRF4 fast ausschließlich auf Zelltypen des hämatopoetischen Systems beschränkt.^{99,100} Am besten untersucht ist die Funktion des Transkriptionsfaktors bei der Differenzierung von B-Zellen und Plasmazellen. Bei der frühen B-Zell-Entwicklung fungieren IRF4 und IRF8 als essentielle Faktoren für die Entstehung von unreifen B-Zellen über die Expressionsunterdrückung verschiedener Gene des prä-B-Zell-Rezeptors.^{101,102} Während die Expression von IRF4 bei B-Zellen in der Keimzentrumsreaktion fast komplett inhibiert ist, führt im späteren Stadium dieses Entwicklungsprozesses die erneute IRF4-Expression durch Aktivierung des NF-κB-Signalwegs zu einer

Differenzierung zu Zentrozyten.¹⁰³ Dies gelingt über die IRF4-induzierte Inaktivierung des transkriptionellen Repressors BCL6.^{104,105} Die Repression von BCL6 führt zusätzlich zur Expression von BLIMP1, dem Hauptregulator der Plasmazellentwicklung, welcher zusammen mit IRF4 die Differenzierung zur Plasmazelle vorantreibt.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Neben der molekularbiologischen Funktion von IRF4 bei der B-Zell-Entwicklung ist die Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Entwicklung verschiedener T-Zell-Populationen besser verstanden. Die Expression von IRF4 erfolgt hier primär über die Stimulation des T-Zell-Rezeptors und der damit einhergehenden Aktivierung des NF-κB-Signalwegs.^{104,109,110} Frühere Untersuchungen an *Irf4*^{-/-} Knock-out-Mäusen zeigten bereits eine starke Deregulation bei der Produktion und Aktivität verschiedener T-Zell-assoziiierter Zytokine.¹¹¹

CD4⁺ T-Zellen differenzieren in verschiedene Subpopulationen, die unterschiedliche Funktionen ausüben und über ihre genetischen Hauptregulatoren und Zytokinprofile unterschieden werden können (Abbildung 4). IRF4 ist in Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor NFATc1 direkt an der Expression des T_H2-Zytokins IL-4 beteiligt.¹¹² Zusätzlich reguliert IRF4 die Expression des T_H2-Hauptregulators GATA3.¹¹³

Als Transkriptionsfaktor bindet IRF4 schwach an das Interferon-stimulierte-Antwort-Element.¹¹⁴ Bei T-Zellen interagiert IRF4 hierfür mit einem Heterodimer der Aktivator-Protein-1-Familie (AP-1) wie JUN oder BATF (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*). Der daraus resultierende IRF4-JUN-BATF-Heterodimer-Komplex bindet anschließend an das so genannte AP-1-IRF4-Element (AICE).¹¹⁵⁻¹¹⁸ Einige Studien zeigten, dass die Entwicklung von T_H2-Zellen abhängig von der Expression von BATF ist.^{119,120} Gleichzeitig konnten bei T_H2-Zellen AICE gefunden werden, was

vermuten lässt, dass IRF4 neben NFATc1 auch mit BATF-JUN-Heterodimeren für die Transkriptionsregulation von T_H2-Zellen zuständig ist.¹¹⁷

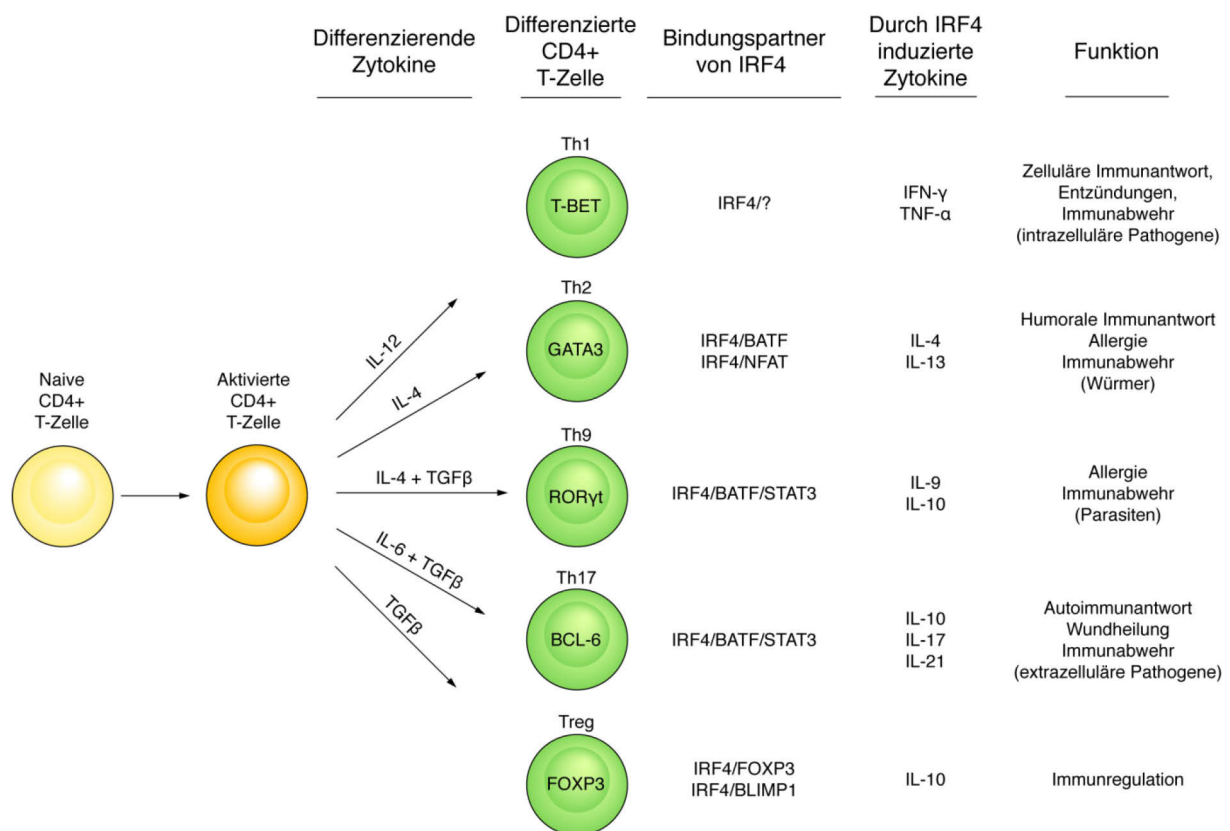


Abbildung 4: Die Rolle von IRF4 bei der Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen. Stimulierte CD4⁺ T-Zellen differenzieren in Gegenwart spezifischer Zytokine in verschiedene Subtypen. Diese Subtypen werden über die Expression eines charakteristischen Transkriptionsfaktors und ein spezielles Zytokinprofil unterschieden. Für die Differenzierung der Subtypen und die Expression der spezifischen Zytokine ist die Expression von IRF4 und weiteren Ko-Aktivatoren von entscheidender Bedeutung. Die Funktionen der einzelnen Subtypen im Netzwerk der Immunantwort sind zusätzlich dargestellt.

Studien an T_H9-Zellen zeigten, dass IRF4 direkt an der Expression des Effektorzytokins IL-9 beteiligt ist. Hier konnten ebenfalls aktive AICE entdeckt werden, die sich in der Promotorregion des *IL-9*-Gens befinden und dessen Expression von IRF4 und BATF reguliert wird.¹²⁰ Zusätzlich zeigten weitere Studien, dass die für die Differenzierung zu T_H17-Zellen notwendigen Zytokine *IL-17*, *IL-21*, *IL-23r* über IRF4-JUN-BATF-Heterodimere reguliert werden.^{116,118} Interessanterweise ließ sich in *Irf4*^{-/-} Knock-out-Mäusen ein etabliertes murines Modell der Multiplen Sklerose nicht entwickeln. Diese Resistenz konnte auf das Fehlen von T_H17-Zellen

zurückgeführt werden.¹²¹ Bei *Batf*^{-/-} Knock-out-Mäusen konnte außerdem keine T-Zell-Differenzierung zu T_H17-Zellen beobachtet werden.¹²²

Neben der Rolle von IRF4 bei der Differenzierung der verschiedenen CD4⁺ T-Zell-Populationen zeigen neue Untersuchungen ähnliche Funktionen bei der Entwicklung von CD8⁺ T-Zellen. So waren *Irf4*^{-/-} Knock-out-Mäuse nicht mehr in der Lage bakterielle Infekte abzuwehren, was bei Mäusen mit intaktem IRF4 möglich war. Injektion von CD8⁺ T-Zellen mit normaler Expression von IRF4 in die *Irf4*^{-/-} Knock-out-Mäuse führte hingegen zu einer normalen Pathogenabwehr.^{110,123} Wie bereits bei der Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen wird hier ebenfalls ein enges Zusammenspiel von IRF4 mit den Transkriptionsfaktoren BATF und JUN vermutet.¹²⁴ Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass IRF4 bei CD8⁺ T-Zellen an der Regulation metabolischer Signalwege beteiligt ist. Ob hierbei ebenfalls IRF4-JUN-BATF-Heterodimere beteiligt sind, ist noch nicht bekannt.¹⁰⁹

1.5.3 Die Rolle von IRF4 bei der Pathogenese maligner Lymphome

Erste Hinweise für eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 bei der Pathogenese maligner Lymphome brachte die Entdeckung einer chromosomalen Translokation bei einer Multiplen Myelom (MM)-Zelllinie, bei der das *IRF4*-Gen an den Locus der schweren Ketten des Immunglobulins versetzt wurde, was zu einer Überexpression von IRF4 führt.¹²⁵ Diese Translokation ist ebenfalls in einer kleinen Anzahl von MM-Patienten zu finden.¹²⁶ Darüber hinaus ist IRF4 bei vielen MM-Zelllinien detektierbar. Unterschiedliche Ansätze zeigen, dass RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation von *IRF4* zur Induktion von Apoptose bei MM-Zelllinien führt.¹²⁷ Diese Veränderung der IRF4-Expression resultierte bei den untersuchten

Zelllinien in einer Deregulation mehrerer Stoffwechsel- und Signalwege. Weitere Untersuchungen machten deutlich, dass IRF4 direkt im Promotor des bekannten onkogenen Transkriptionsfaktors MYC bindet und dessen Expression hochreguliert.^{127,128}

Zusätzlich zeigen diffus großzellige B-Zell-Lymphome vom aktivierten B-Zell-Typ (ABC-DLBCL) oder HL ebenfalls eine hohe IRF4-Expression.¹²⁹⁻¹³¹ Diese Überexpression wird über die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs hervorgerufen.^{128,132-134} Die RNA-Interferenz-vermittelte Herunterregulation von *IRF4* bei HL-Zelllinien induzierte Apoptose und eine Veränderung der Expression verschiedener Zytokine.¹³⁵ Bei ABC-DLBCL konnte gezeigt werden, dass IRF4 über die Interaktion mit IRF7 entscheidend an der Repression des Interferon-Signalwegs beteiligt ist und die Inhibierung dieser Repression im Zelllinienmodell zu Zytotoxizität führt.¹³⁶

Bei verschiedenen peripheren T-Zell-Lymphomen, insbesondere dem kutanen ALCL, konnten ebenfalls *IRF4*-Translokationen nachgewiesen werden.¹³¹ Als alternativer molekularer Mechanismus konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Auslöser der adulten T-Zell-Leukämie, dem humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1), zu einer NF-κB-induzierten Überexpression von IRF4 führen kann.¹³⁷ Gleichzeitig konnte im Rahmen kleinerer Studien zwar die Expression von IRF4 bei bestimmten T-Zell-Lymphomen gezeigt werden, doch der zugrundeliegende Mechanismus der Überexpression und die Rolle des Transkriptionsfaktors bei der molekularen Pathogenese ist, anders als bei den beschriebenen B-Zell-Lymphomen, noch nicht verstanden.¹²⁹⁻¹³¹

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die essentielle Funktion des Transkriptionsfaktors IRF4 bei der Pathogenese verschiedener B-Zell-Lymphome konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden. Hierbei wurde IRF4 als zentraler Transkriptionsfaktor im Genexpressionsnetzwerk der unterschiedlichen onkologischen Entitäten beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die Expression von IRF4 zu einem Proliferationsvorteil führt und die Herunterregulation einen globalen Einfluss auf die Expression und Aktivität essentieller Gene und Signalwege hat.^{127,135,136} Im Rahmen mehrerer kleinerer Studien konnte bereits die hohe Expression von IRF4 bei ALK-positiven und ALK-negativen ALCL-Patientenproben beschrieben werden.¹²⁹⁻¹³¹ Jedoch sind die Rolle und die Funktion von IRF4 bei der molekularen Pathogenese des ALCL bisher nicht vollständig verstanden.

Anhand großer Patientenkohorten soll zu Beginn dieser Arbeit die IRF4-Expression bei ALK-positiven und ALK-negativen ALCL-Patientenproben erneut immunhistochemisch bestimmt werden um mögliche Unterschiede bei der Expression beider Subtypen zu ermitteln. Für die funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung von IRF4 sollen anschließend geeignete *in vitro*-Zelllinienmodelle bestimmt werden. Über die retrovirale Transduktion dieser Zelllinien mit spezifischen shRNAs gegen die mRNA von *IRF4* soll anschließend der Einfluss von IRF4 auf das Genexpressionsnetzwerk des ALCL systematisch analysiert und die Konsequenzen auf Ebene der Protein- und mRNA-Expression bestimmt und molekularbiologisch überprüft werden. Ziel ist eine klare Einordnung von IRF4 bei der molekularen Pathogenese des ALCL, um zu überprüfen, ob das IRF4-gesteuerte Genexpressionsnetzwerk zukünftig ein therapeutisches Ziel beim ALCL darstellt.

2 ERGEBNISSE

2.1 Bestimmung der IRF4-Expression bei primären ALCL-Patientenbiopsien

Kleinere Studien zeigten bereits, dass bei primären ALCL-Patientenproben der Transkriptionsfaktor IRF4 exprimiert wird.¹²⁹⁻¹³¹ Um diese Expression zu bestätigen untersuchten wir initial, bei einer deutlich größeren Anzahl von ALCL-Patientenbiopsien, die Expression von IRF4 (Abbildung 5).¹³⁸

Die Untersuchung der IRF4-Expression bei primären ALCL-Patientenproben wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Alexander Tzankov und Prof. Dr. Stephan Dirnhofer vom Universitätsspital Basel, Prof. Dr. German Ott aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart, Prof. Dr. Andreas Rosenwald von der Universität Würzburg, sowie Prof. Dr. Michael Hummel und Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos von der Charité - Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

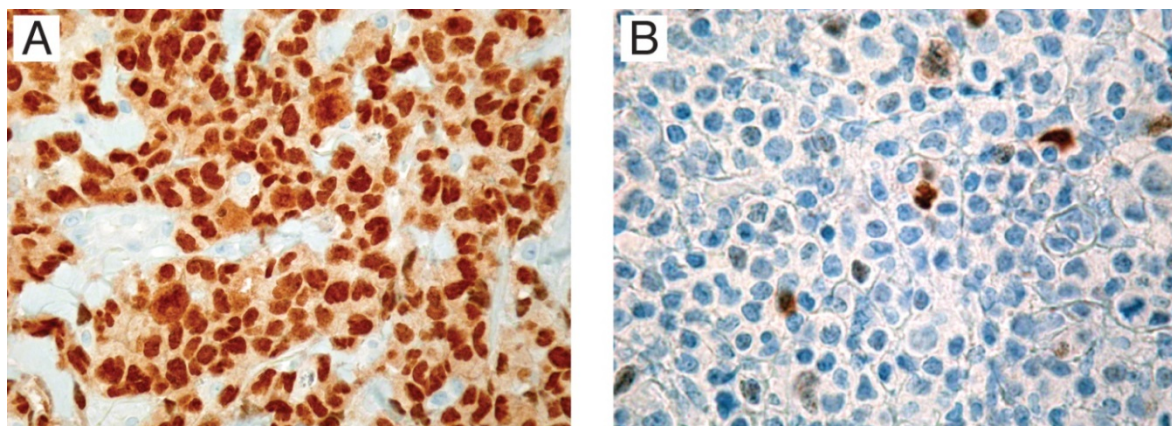


Abbildung 5: Immunhistochemische Bestimmung von IRF4 bei primären ALCL-Patientenproben. A) IRF4-positive ALCL-Patientenprobe mit interner Negativkontrolle (tumorinfiltrierende Makrophagen und Endothelzellen). B) IRF4-negative ALCL-Patientenprobe; (A+B Vergrößerung 320x).

Die Untersuchung von 38 ALK-positiven und 44 ALK-negativen ALCL-Biopsien offenbarte eine IRF4-Expression bei 75 von 82 (91%) ALCL-Patientenproben

(Abbildung 6). Dabei exprimierten ALK-negative ALCLs signifikant häufiger IRF4 verglichen mit ALK-positiven ALCLs ($P = 0,045$; Exakter Test nach Fisher).

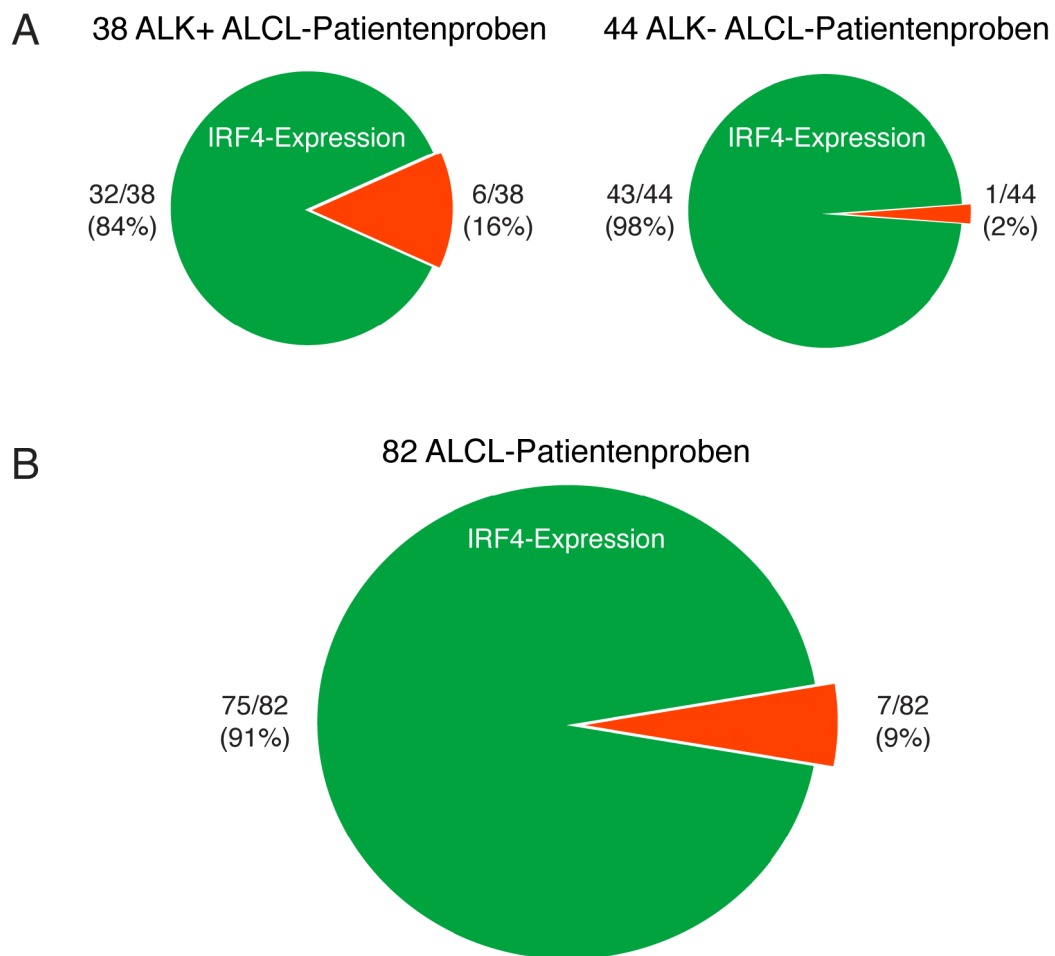


Abbildung 6: Inzidenz der IRF4-Expression bei primären ALCL-Patientenproben. A) Expression von IRF4 bei ALK+ und ALK- ALCL-Patientenproben B) Expression von IRF4 bei allen untersuchten ALCL-Patientenproben.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der Transkriptionsfaktor IRF4 bei einem Großteil der untersuchten primären ALCL-Patientenproben exprimiert wird. Diese Daten legen nahe, dass IRF4 eine Rolle bei der molekularen Pathogenese des ALCL spielen könnte.

2.2 IRF4-Expression bei ALCL-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob ALCL-Zelllinien geeignete funktionelle Modelle darstellen, analysierten wir die IRF4-Expression bei sechs ALCL-Zelllinien sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Eine Expression von *IRF4* konnte bei allen ALCL-Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Zelllinien K299, JB6, DEL, FE-PD und Mac-2A eine hohe mRNA-Expression im Vergleich zur *IRF4*-exprimierenden MM-Zelllinie (Multiples Myelom) H929, die als Positivkontrolle verwendet wurde (Abbildung 7).¹²⁷

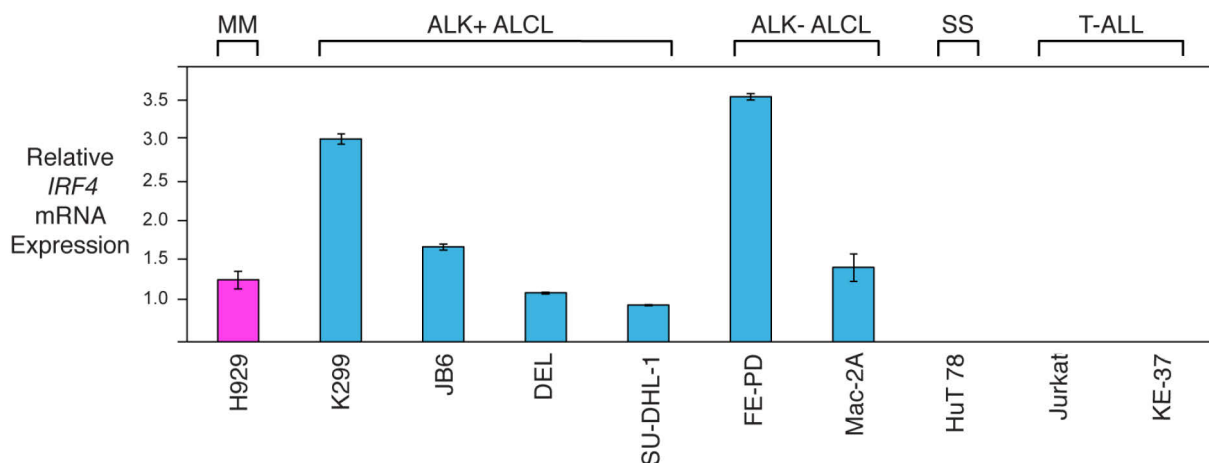


Abbildung 7: Analyse der *IRF4*-mRNA-Expression bei ALCL-Zelllinien. Mittels quantitativer RT-PCR wurde bestätigt, dass die untersuchten ALCL-Zelllinien (blau) *IRF4* unterschiedlich stark exprimieren. Die Zelllinie H929 diente als Positivkontrolle (pink), die T-ALL-Zelllinien (akute lymphatische Leukämie vom T-Zell-Typ) und die SS-Zelllinie (Sézary-Syndrom) als Negativkontrollen; Die *IRF4*-Expression wurde auf die Expression von *GAPDH* normalisiert, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die IRF4-Proteinexpression wurde über die Methode des Immuno-Blots ermittelt (Abbildung 8). Auffällig ist hier, dass die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 im Vergleich zu allen anderen ALCL-Zelllinien am wenigsten IRF4 exprimiert. Gleichzeitig zeigen die T-ALL-Zelllinien Jurkat und KE-37 keine, sowie die SS-Zellline HuT 78, eine schwache Expression. Die IRF4-Expression konnte erneut bei der als Positivkontrolle eingesetzten MM-Zelllinie H929 nachgewiesen werden.¹²⁷

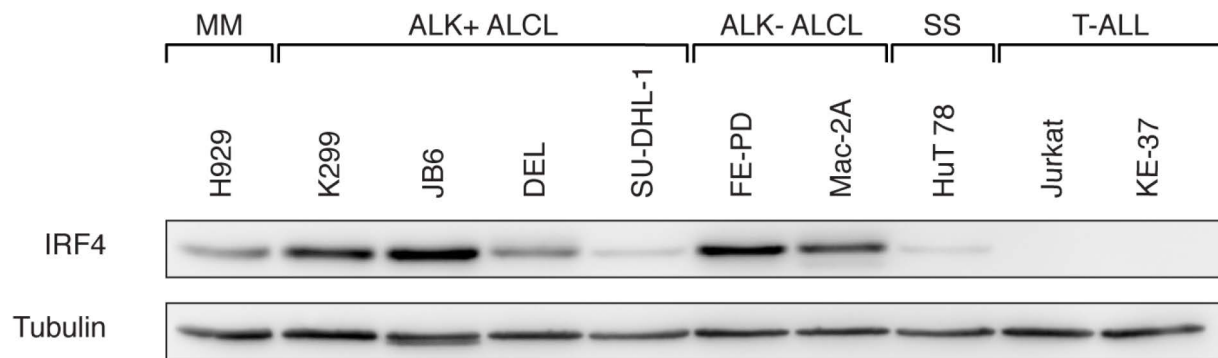


Abbildung 8: Analyse der IRF4-Proteinexpression bei ALCL-Zelllinien. Mittels Immuno-Blot wurde bestätigt, dass die untersuchten ALCL-Zelllinien IRF4 unterschiedlich stark exprimieren. Die Zelllinie H929 diente als Positivkontrolle, die T-ALL-Zelllinien und die SS-Zelllinie als Negativkontrollen.

Diese Ergebnisse suggerieren, dass die ALCL-Zelllinien ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der molekularbiologischen Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 beim ALCL darstellen.

2.3 ALCLs sind von der Funktion von IRF4 abhängig

Für die funktionelle Untersuchung des Transkriptionsfaktors IRF4 bei ALCL-Zelllinien regulierten wir mittels *small hairpin* RNAs (shRNA) die *IRF4*-mRNA über den Mechanismus der RNA-Interferenz, posttranskriptionell herunter.^{127,139} Die erfolgreiche Herunterregulation der *IRF4*-mRNA konnte exemplarisch bei den ALCL-Zelllinien K299, JB6, DEL und Mac-2A über die signifikant verminderte mRNA-Expression, nach 48-stündiger shRNA-Induktion bestätigt werden (Abbildung 9).

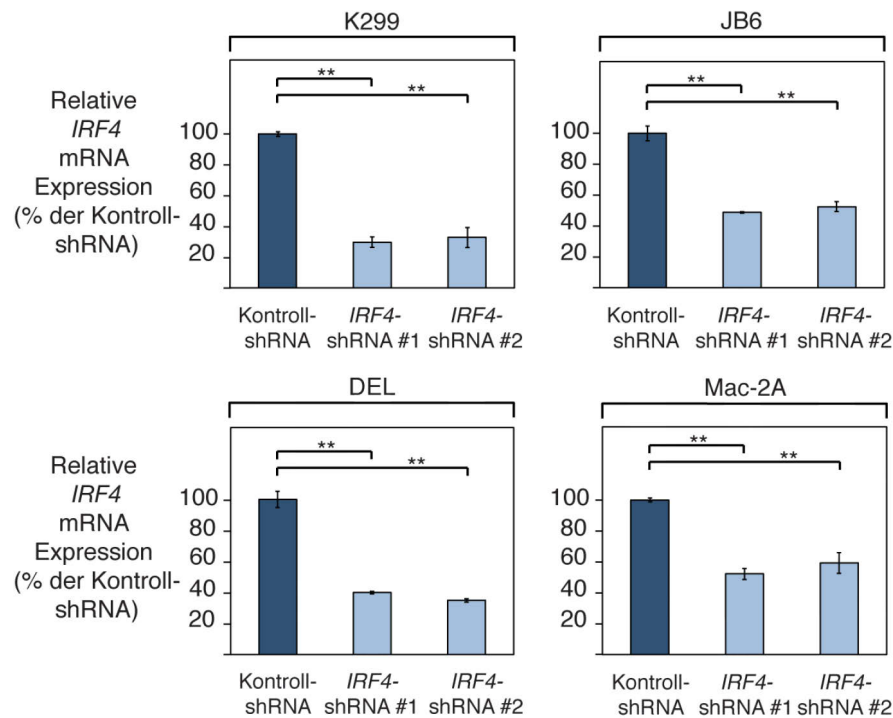


Abbildung 9: shRNA-vermittelte Herunterregulation von IRF4 auf RNA-Ebene. Mittels quantitativer RT-PCR wurde bestätigt, dass beide verwendeten shRNAs nach 48h zu einer signifikanten Expressionsverringern von IRF4 bei den verwendeten ALCL-Zelllinien führten. Die IRF4-Expression wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Zusätzlich konnte bei denselben Zelllinien gezeigt werden, dass eine Verminderung der IRF4-mRNA-Expression ebenfalls die Expression des IRF4-Proteins reduzierte (Abbildung 10).

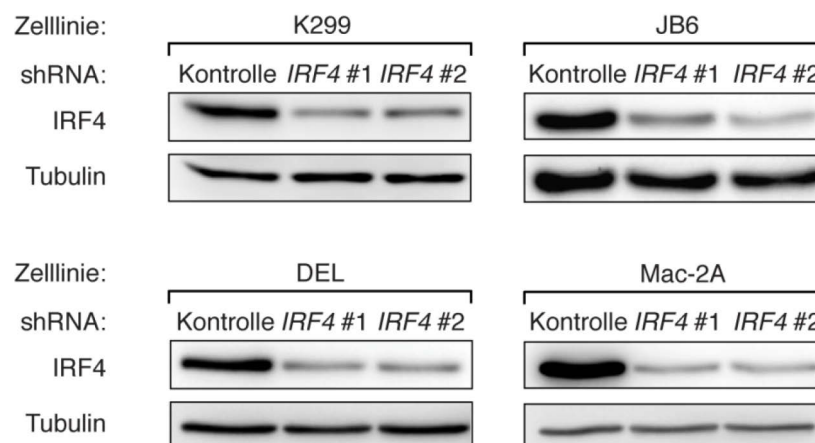


Abbildung 10: shRNA-vermittelte Herunterregulation von IRF4 auf Proteinebene. Mittels Immuno-Blot wurde bestätigt, dass beide verwendeten shRNAs nach 96h zu einer Herunterregulation von IRF4 bei den verwendeten ALCL-Zelllinien führten.

Für die retrovirale Transduktion der Zelllinien wurde ein Vektor gewählt, der nach erfolgreicher Infektion neben der shRNA auch die cDNA eines Grün-fluoreszierenden-Proteins (GFP) exprimiert. Dies ermöglichte es zu beliebigen Zeitpunkten das Verhältnis der transduzierten GFP-positiven Population zur untransduzierten GFP-negativen Population durchflusszytometrisch zu ermitteln und zu vergleichen.

Alle ALCL-Zelllinien (K299, JB6, DEL, Mac-2A, FE-PD), die phänotypisch eine starke *IRF4*-Expression aufwiesen, zeigten Zytotoxizität nach shRNA-induzierter Herunterregulation von *IRF4* (Abbildung 11). Dieser Effekt konnte unabhängig des ALK-Status mit zwei verschiedenen shRNAs bestätigt werden. Lediglich bei der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1, die eine geringe *IRF4*-Expression aufwies, zeigte sich keine Veränderung der Viabilität. Gleiche traf auch auf die beiden *IRF4*-negativen T-ALL-Zelllinien Jurkat und KE-37, sowie die SS-Zelllinie HuT 78 zu. Wie erwartet induzierte die Herunterregulation von *IRF4* Zytotoxizität bei der MM-Zelllinie H929, die als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Expression einer Kontroll-shRNA gegen die mRNA einer Monooxygenase (*MSMO1*) zeigte keine toxischen Effekte bei allen infizierten Zelllinien.

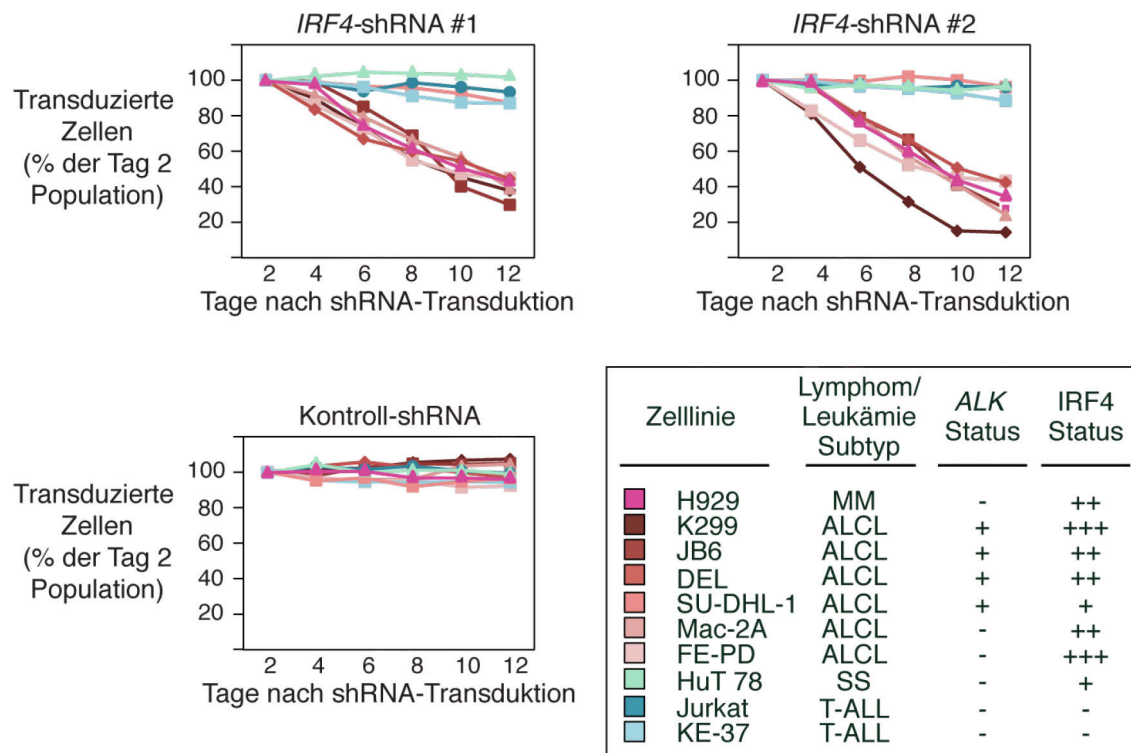


Abbildung 11: ALCL-Zelllinien sind abhängig von der *IRF4*-Expression. Unabhängig des ALK-Status zeigen alle ALCL-Zelllinien, die eine starke *IRF4*-Expression aufweisen, Zytotoxizität nach Herunterregulation von *IRF4* mit zwei unterschiedlichen shRNAs. *IRF4*-negative Zelllinien zeigen keine Änderung der Viabilität. Die Expression einer Kontroll-shRNA gegen *MSMO1* induzierte keine Zytotoxizität.

Zur Bestätigung der Spezifität der verwendeten *IRF4*-shRNAs wurden anschließend ALK-positive und ALK-negative ALCL-Zelllinien mit einer *IRF4*-cDNA transduziert, um ein so genanntes *Rescue*-Experiment durchzuführen. Die exogene Expression der *IRF4*-cDNA verhinderte den über die *IRF4*-shRNAs induzierten toxischen Phänotyp. Die Expression des Leervektors alleine führte zu keiner Verringerung der Zytotoxizität (Abbildung 12).

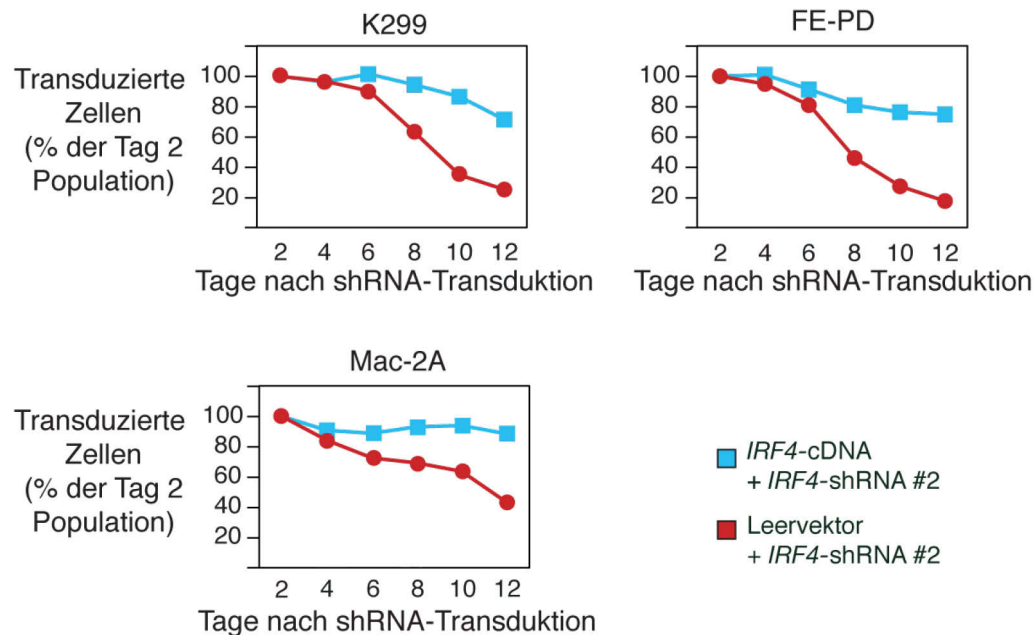


Abbildung 12: Die Expression der *IRF4*-cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen *IRF4*. Durch die Ko-Expression der *IRF4*-cDNA wird die Zytotoxizität einer 3'UTR bindenden shRNA verhindert (blau).

Um diese Beobachtungen in ein *in vivo*-Modell zu translatieren, wurde in enger wissenschaftlicher Zusammenarbeit mit Dr. Iduna Fichtner und Dr. Antje Siegert ein ALCL-Xenograft-Mausmodell der beiden ALK-positiven ALCL-Zelllinien K299 und JB6 etabliert. Beide Zelllinien trugen entweder eine shRNA gegen *IRF4* oder die Kontroll-shRNA gegen *MSMO1*. Proteinproben, die aus den Tumoren gewonnen wurden, konnten die erfolgreiche Herunterregulation von *IRF4* bestätigen (Abbildung 13A). Es zeigte sich zusätzlich, dass die shRNA-induzierte Herunterregulation von *IRF4* Einfluss auf das Wachstum des Tumors hat. Nach vierzehn Tagen zeigten *IRF4*-shRNA-tragende Lymphome ein signifikant geringeres Tumolvolumen als die Lymphome, die mit der Kontroll-shRNA infiziert wurden (Abbildung 13B).

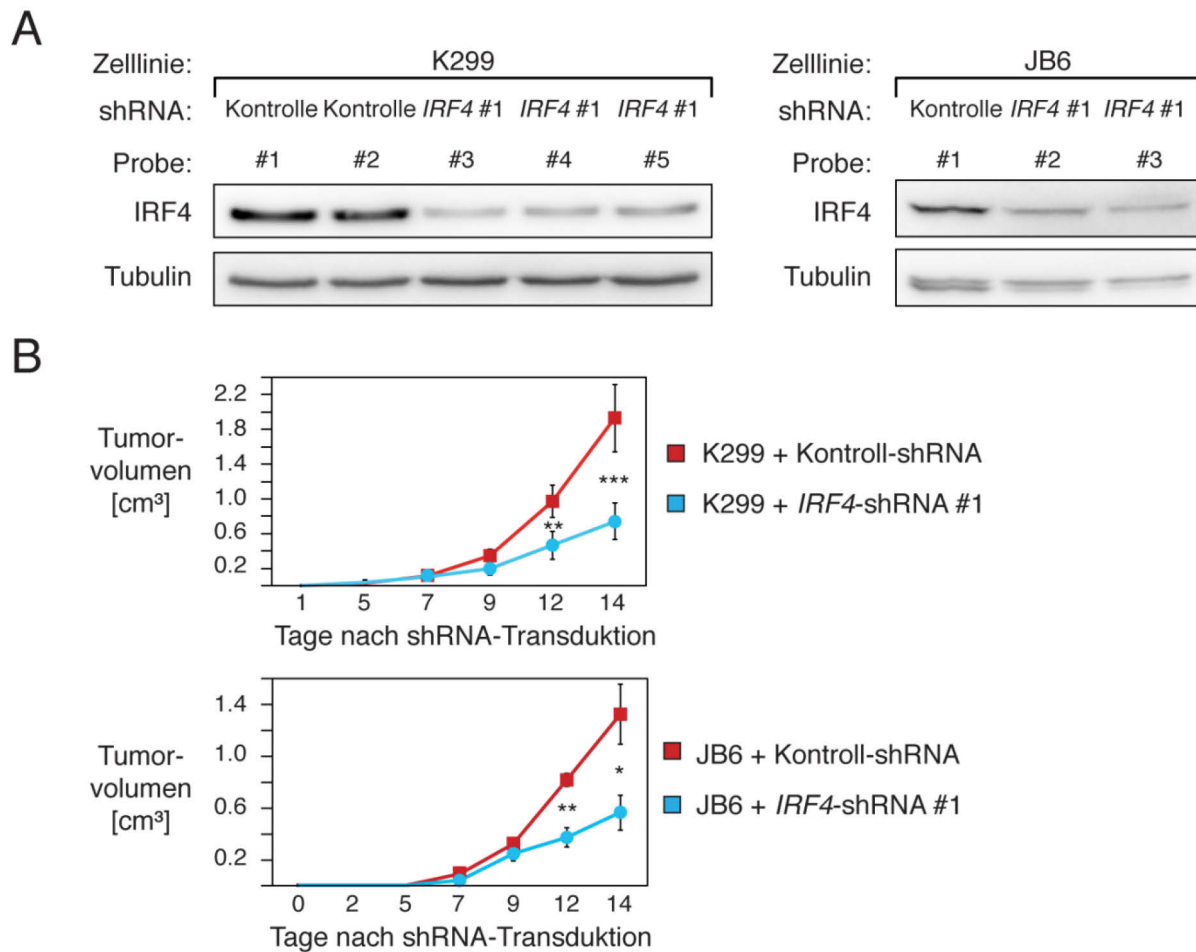


Abbildung 13: Herunterregulation von *IRF4* bei ALCL-Xenograft-Mausmodellen. A) Bestätigung der Herunterregulation von *IRF4* bei Tumorbiopsien der Xenograft-Mäuse. B) Die Herunterregulation von *IRF4* bei ALCL-Xenograft-Mausmodellen führte zu einem signifikant langsameren Tumorwachstum (blau) im Vergleich zu Kontroll-shRNA tragenden Tumoren (rot); Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Zusammenfassend zeigte sich *in vitro* und *in vivo* eine Abhängigkeit des ALCLs von der Expression des Transkriptionsfaktors *IRF4*, unabhängig von dem Vorhandensein einer *ALK*-Translokation.

2.4 Untersuchung des durch IRF4 kontrollierten Genexpressionsnetzwerks

Um die Konsequenz der Herunterregulation von IRF4 auf das Genexpressionsnetzwerk beim ALCL zu untersuchen, kollaborierten wir mit Dr. Michael Grau und Prof. Dr. Peter Lenz von der Universität Marburg. Hierfür führten wir bei den drei ALCL-Zelllinien DEL, K299 und FE-PD Genexpressionsanalysen nach Herunterregulation von *IRF4* durch. Dabei wurden für jede verwendete ALCL-Zelllinie zu vier Zeitpunkten (24h, 48h, 72h, 96h) Genexpressionsprofile nach *IRF4*-shRNA-Induktion erstellt und mit den Genexpressionsprofilen uninduzierter Zellen verglichen.

Für einen besseren Überblick über die Änderungen des Genexpressionsnetzwerks nach Herunterregulation von *IRF4*, unabhängig des ALK-Status, erstellten wir spezielle Signaturen aus Genen, die bei allen drei ALCL-Zelllinien signifikant herunter- bzw. hochreguliert waren. Hierbei identifizierten wir 115 signifikant herunterregulierte Gene ($P = 0.0025$; *False Discovery Rate* (FDR) = 0.001; gepaarter *t*-test) und 211 signifikant hochregulierte Gene ($P = 0.0025$; FDR = 0.001; gepaarter *t*-test) nach Herunterregulation von *IRF4*, die wir anschließend in zwei Genexpressionssignaturen zusammenfassten (Abbildung 14; Anhang: Tabelle 6).

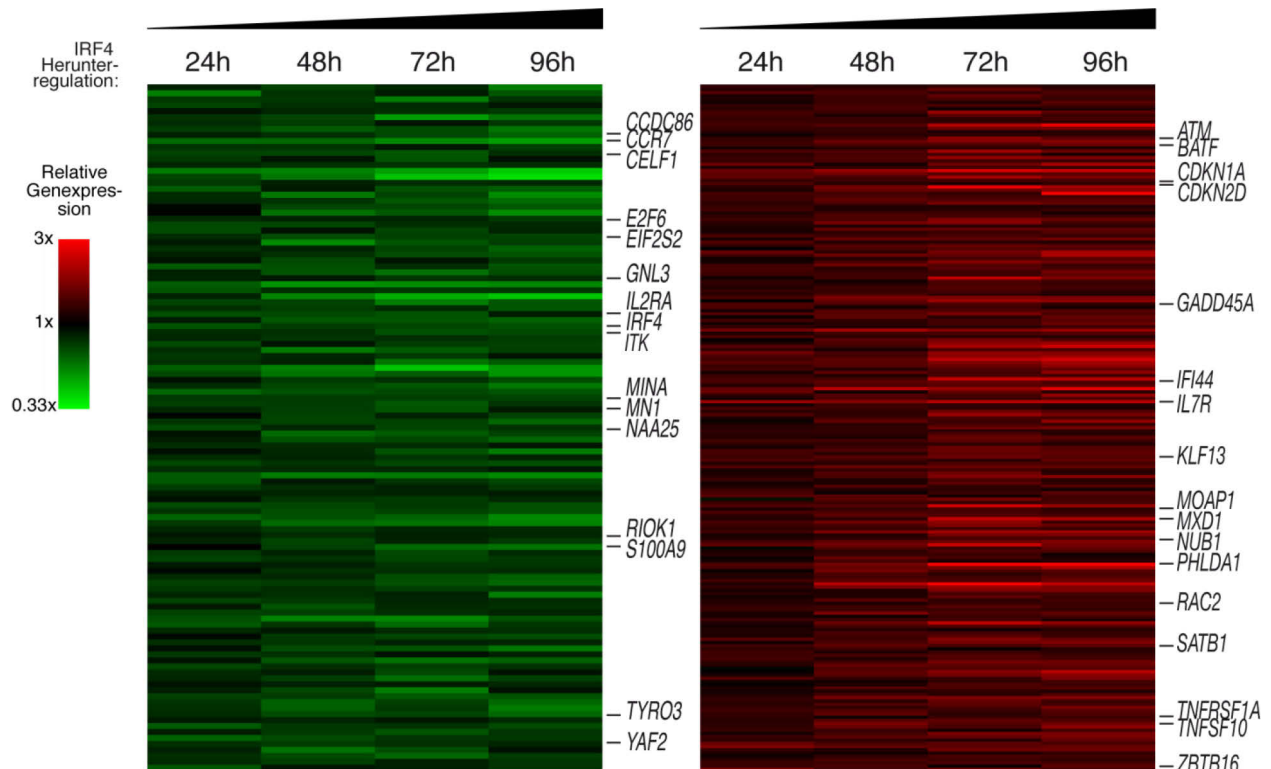


Abbildung 14: IRF4-kontrollierte Genexpressionsnetzwerke. 24h, 48h, 72h und 96h nach Herunterregulation von *IRF4* bei den ALCL-Zelllinien DEL, K299 und FE-PD wurde die Veränderung der Geneexpression ermittelt. Proben mit induzierter shRNA wurden hierbei mit uninduzierten Proben verglichen. Dargestellt sind Gene, die bei allen drei Zelllinien signifikant herunter- bzw. hochreguliert waren; $P=0.0025$, FDR = 0.001, gepaarter t -test.

Die Herunterregulation von *IRF4* bei ALK-positiven und ALK-negativen ALCLs dereguliert die Expression verschiedener Gene, die an kritischen zellulären Prozessen beteiligt sind. So fanden wir eine veränderte Expression von Genen der Zellzyklusregulation bzw. der Zellzykluskontrolle (z.B. *CDKN1A*, *CDKN2D*, *E2F6*), Genen der Proliferationsregulation (z.B. *BAG2*, *CELF1*, *TYRO3*) und Genen der DNA-Reparatur (z.B. *ATM*, *LIG3*). Zusätzlich stellten wir die Deregulation von Genen fest, die als Zielgene des onkogenen Transkriptionsfaktors MYC beschrieben sind (z.B. *GNL3*, *MINA*). Ergänzend dazu zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der *MYC*-mRNA nach *IRF4*-shRNA-Induktion bei den untersuchten ALCL-Zelllinien ($P = 0.01$; gepaarter t -test).

Diese Daten zeigen, dass die Herunterregulation von *IRF4* bei ALCL-Zelllinien unabhängig des ALK-Status einen signifikanten Einfluss auf die Expression von Genen essentieller zellregulatorischer Prozesse und zusätzlich auf die Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors *MYC* hat.

2.5 Herunterregulation von *IRF4* vermindert die Expression von *MYC* beim ALCL

Um die Daten der Genexpressionsanalyse systematisch zu analysieren, führten wir eine so genannte *Gene Set Enrichment*-Analyse (GESA) durch.^{140,141} Dabei war die am signifikantesten herunterregulierte Gensignatur mit dem Onkogen *MYC* assoziiert (Abbildung 15; Anhang: Tabelle 7, $P < 0,001$; FDR = 0,001). Zusätzlich konnten zwei weitere Signaturen identifiziert werden, deren Gene zum einen *MYC*-regulierte Gene enthielten und zum anderen ebenfalls nach *IRF4*-Herunterregulation dereguliert waren (Anhang: Tabelle 7, $P < 0,001$; FDR = 0,001).

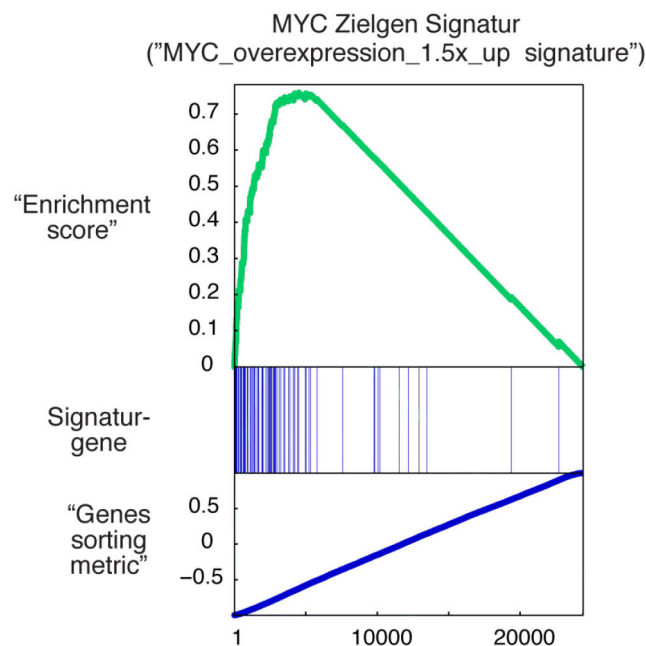


Abbildung 15: Herunterregulation von *IRF4* induziert eine Herunterregulation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *MYC*. *Gene Set Enrichment*-Analyse nach Herunterregulation von *IRF4* bei den ALCL-Zelllinien DEL, K299 und FE-PD; $P < 0,001$; FDR = 0,001.

Darüber hinaus untersuchten wir weitere MYC-assoziierte-Signaturen aus der *Molecular Signatures Database*.¹⁴² Fünf zusätzliche, unabhängige Signaturen konnten identifiziert werden und bestätigten, dass MYC-assoziierte Gene nach *IRF4*-Herunterregulation dereguliert waren (Anhang: Tabelle 8).

Zusammenfassend implizieren diese Daten, dass die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors *IRF4* bei ALCL-Zelllinien zu einer Deregulation von Zielgenen des onkogenen Transkriptionsfaktors MYC führt.

2.6 MYC-Expression nach Herunterregulation von *IRF4* bei ALCL-Zelllinien

Zur Bestätigung der Genexpressionsdaten überprüften wir, ob die Herunterregulation von *IRF4* einen Einfluss auf die Expression von MYC auf mRNA- und Proteinebene hat. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei den ALK-positiven ALCL-Zelllinien K299 und JB6 als auch bei der ALK-negativen ALCL-Zelllinie FE-PD die Herunterregulation von *IRF4* zu einer signifikanten Herunterregulation der *MYC*-mRNA führt (Abbildung 16).

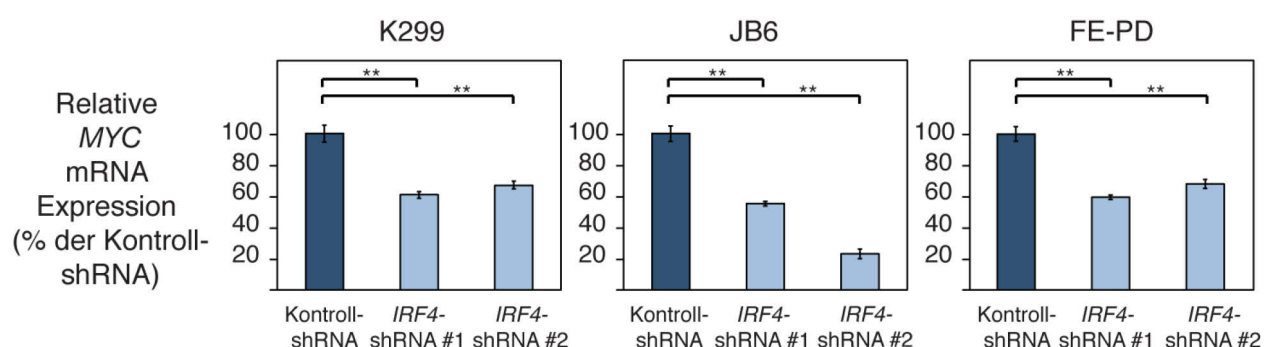


Abbildung 16: shRNA-vermittelte Herunterregulation von *IRF4* führt zu einer Herunterregulation von *MYC*. Mittels quantitativer RT-PCR wurde bestätigt, dass beide verwendeten shRNAs gegen *IRF4* nach 48h zu einer signifikanten Expressionsverringern von *MYC* bei den verwendeten ALCL-Zelllinien führten. Die *MYC*-Expression wurde auf die Expression von *GAPDH* normalisiert; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Gleichzeitig konnten wir mittels Immuno-Blot bestätigen, dass die Herunterregulation von *IRF4* ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von *MYC* auf Proteinebene hat (Abbildung 17A).

Um zu untersuchen, ob dies auch *in vivo* bestätigt werden kann, überprüften wir die *MYC*-Expression bei den Tumorproben des ALCL-Xenograft-Mausmodells. Es zeigte sich, dass bei den Lymphomen der Kontrollmäuse mehr *MYC* exprimiert wurde als bei Tumoren, die eine shRNA gegen *IRF4* trugen (Abbildung 17B).

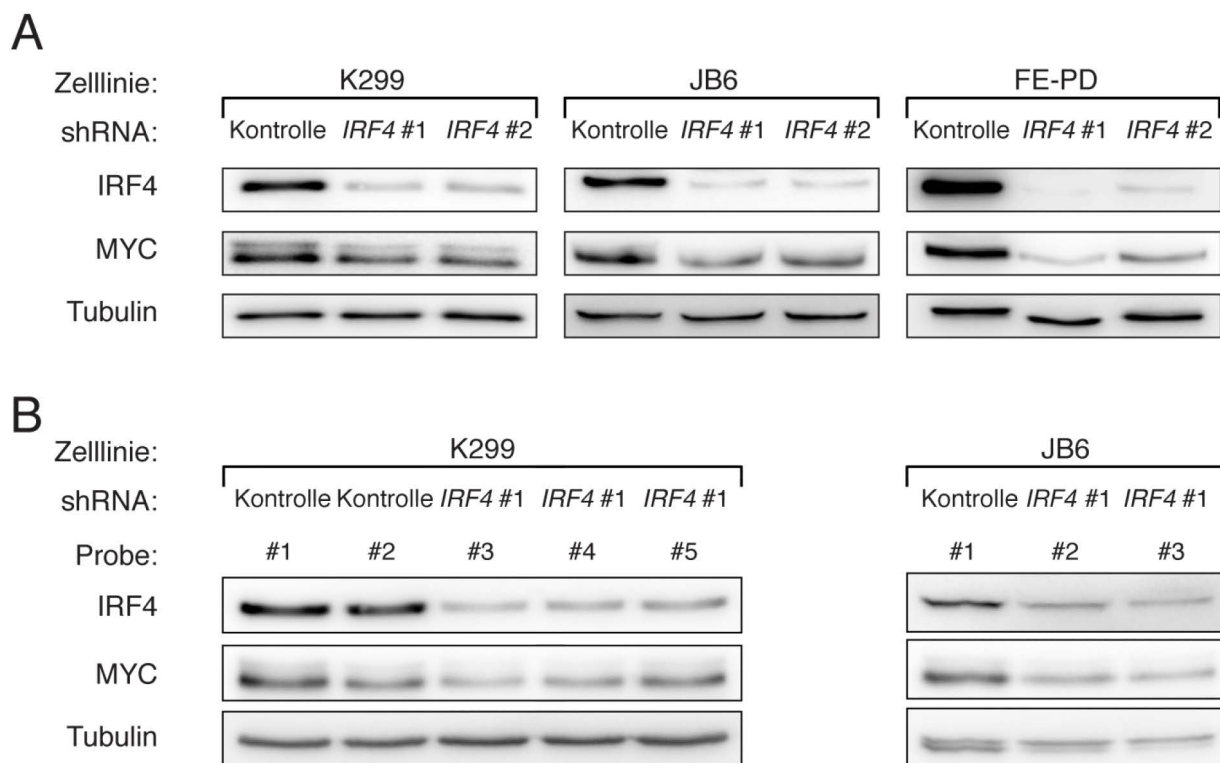


Abbildung 17: shRNA-vermittelte Herunterregulation von *IRF4* führt zu einer Herunterregulation von *MYC* auf Proteinebene. A) Mittels Immuno-Blot wurde bestätigt, dass beide verwendeten shRNAs gegen *IRF4* nach 96h zu einer Expressionsverringerung von *MYC* bei den verwendeten ALCL-Zelllinien führten. B) Bei den Proteinproben des ALCL-Xenograft-Mausmodells führte die Herunterregulation von *IRF4* ebenfalls zu einem Rückgang der Expression von *MYC*.

Da *IRF4* als Transkriptionsfaktor an der direkten Regulation von Genen beteiligt ist, überprüften wir, ob *MYC* ein primäres oder sekundäres Ziel von *IRF4* darstellt. Hierfür untersuchten wir mittels Chromatin-Immunpräzipitation bei den Zelllinien DEL (ALK-positiv) und FE-PD (ALK-negativ) bekannte Bindungsstellen von *IRF4* im

Promotor des *MYC*-Gens (Abbildung 18). Mit publizierten Primern für den Bereich 400 Basen vor bzw. 300 Basen nach dem Startcodon der *MYC*-mRNA konnte in beiden Zelllinien IRF4-Bindung nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente ein Locus, der auf dem Chromosom 7 mit dem Gen *SDK1* assoziiert ist und bereits in mehreren Studien keine Bindung von IRF4 zeigte.^{136,143}

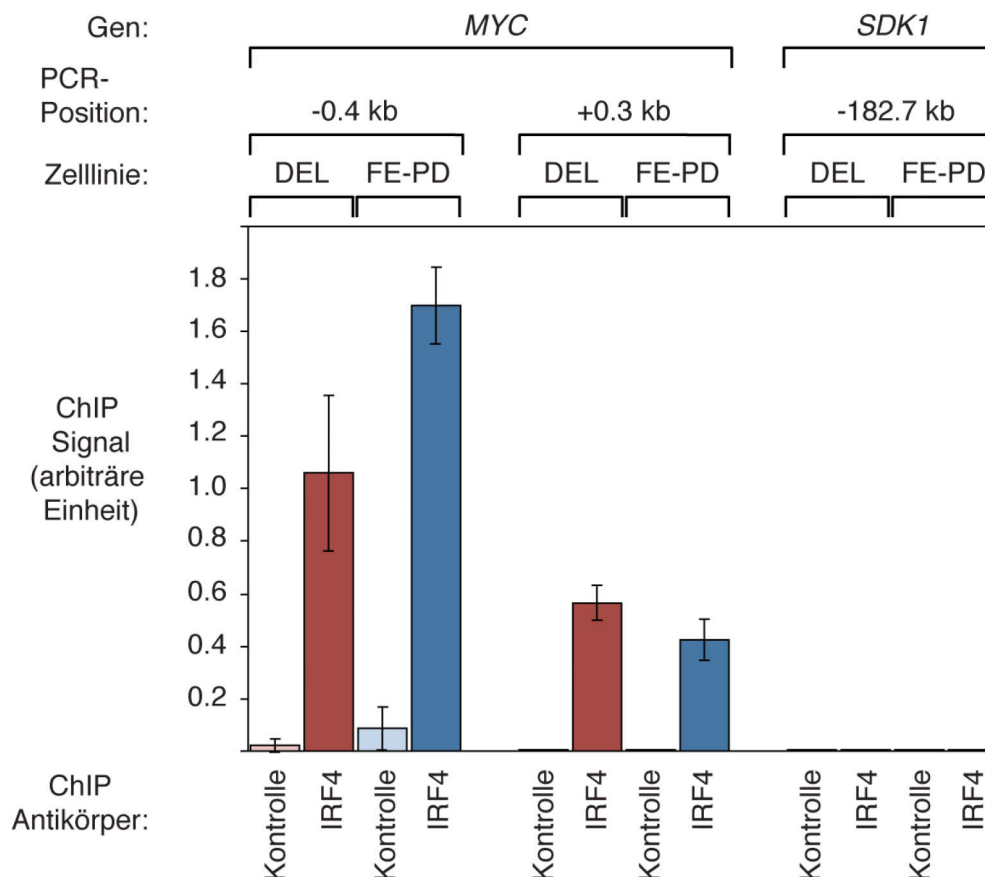


Abbildung 18: IRF4 bindet im *MYC*-Promotor bei ALCL-Zelllinien. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass IRF4 bei einer ALK-positiven (DEL) und einer ALK-negativen (FE-PD) ALCL-Zelllinie in zwei Bereichen des *MYC*-Promotors bindet. Als Kontrolle diente ein Locus auf dem Chromosom 7 (*SDK1*), in dem bereits mehrfach keine Bindung von IRF4 detektiert werden konnte. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes.

Eine ältere Studie beschreibt bereits den Zusammenhang zwischen der Expression von IRF4 und dem NPM-ALK-Fusionsproteins bei ALK-positiven ALCLs.¹⁴⁴ Um zu überprüfen, ob die Inhibierung dieses Signalwegs mit einem etablierten NPM-ALK-Inhibitor ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von *MYC* hat, inkubierten wir die ALK-positiven ALCL-Zelllinien K299 und JB6, sowie die ALK-negativen Zelllinien FE-

PD und Mac-2A mit 150nM Crizotinib für 24h. Bei beiden ALK-positiven ALCL-Zelllinien zeigte sich ein Rückgang der Proteinexpression von IRF4 und MYC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe (Abbildung 19).

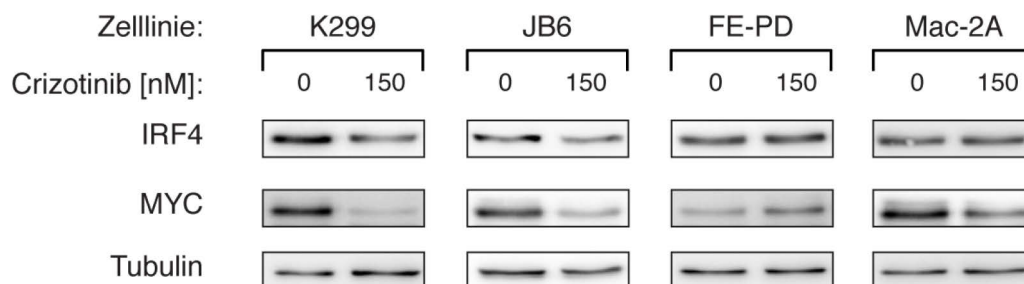


Abbildung 19: NPM-ALK reguliert IRF4 und MYC bei ALK-positiven ALCLs. 24h nach Inkubation der ALK-positiven und ALK-negativen ALCL-Zelllinien mit 150nM des NPM-ALK Inhibitors Crizotinib konnte ein Rückgang der IRF4 und MYC Expression bei den ALK-positiven Zelllinien ermittelt werden.

Zusammenfassend legen unsere Daten nahe, dass *MYC* ein primäres Zielgen des Transkriptionsfaktors IRF4 bei ALCL-Zelllinien ist und die Herunterregulation von IRF4 einen direkten Einfluss auf die Expression von MYC auf mRNA- und Proteinebene hat. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei ALK-positiven ALCL-Zelllinien die Expression von IRF4 und MYC über die pharmakologische Inhibierung der ALK-Tyrosinkinase herunterreguliert werden kann.

2.7 MYC-Expression ist essentiell für die Viabilität von ALCL-Zelllinien

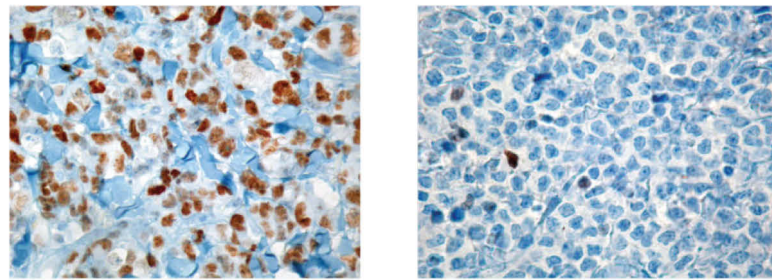
Die immunhistochemische Untersuchung der MYC-Expression bei der 82 Patientenproben umfassenden ALCL-Patientenkohorte bestätigte eine starke Expression des Transkriptionsfaktors MYC (Abbildung 20B). Es konnte gezeigt werden, dass 69 von 82 (84%) der ALCL-Patientenproben MYC-positiv gefärbt werden konnten. Diese Expression ist unabhängig von der Expression eines ALK-Fusionsproteins, da sowohl ALK-positive- als auch ALK-negative ALCL-

Patientenproben eine starke MYC-Expression aufwiesen. Abschließend analysierten wir die Ko-Expression von IRF4 und MYC. Es zeigte sich, dass ALK-positive Patientenproben signifikant häufiger IRF4 und MYC ko-exprimieren als ALK-negative Patientenproben. ($P = 8,3 \times 10^{-4}$ Exakter Test nach Fisher).

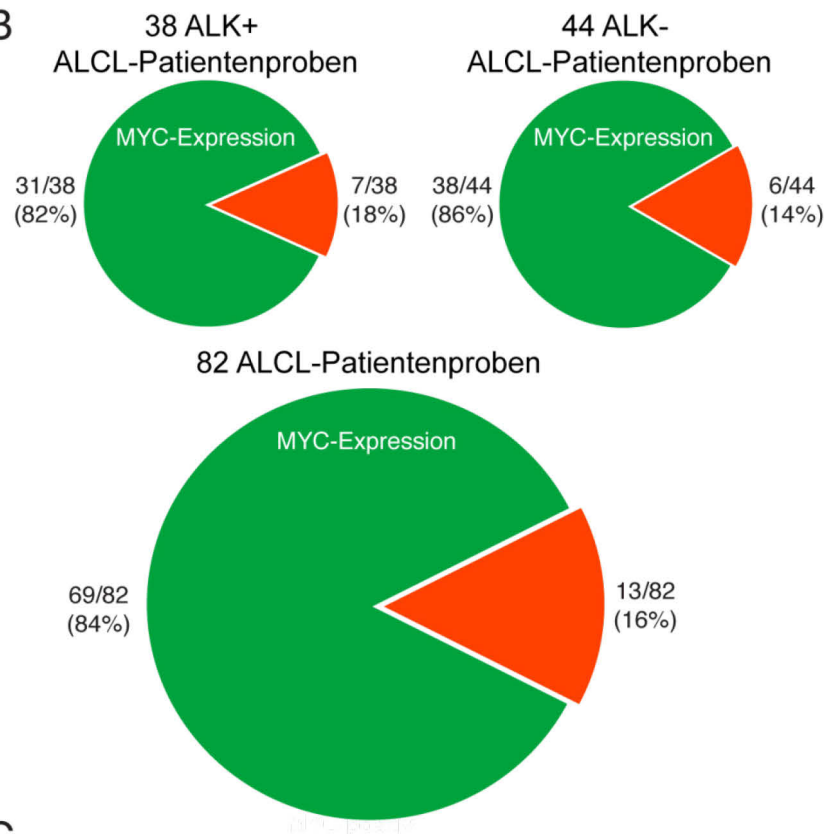
Neben der Expression bei primären ALCLs, untersuchten wir die MYC-Expression mittels Immuno-Blot bei den ALCL-Zelllinien K299, JB6, DEL, SU-DHL-1, Mac-2A und FE-PD. Die Expression konnte bei allen untersuchten ALCL-Zelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die als Negativkontrolle eingesetzte MM-Zelllinie U266, wie bereits beschrieben, keine Expression von MYC (Abbildung 20C).¹⁴⁵

Um die molekularbiologische Rolle von MYC bei der Pathogenese des ALCLs zu untersuchen, klonierten wir zwei publizierte shRNAs gegen die MYC-mRNA und untersuchten deren Funktionalität mittels Immuno-Blot.¹⁴⁶

A



B



C

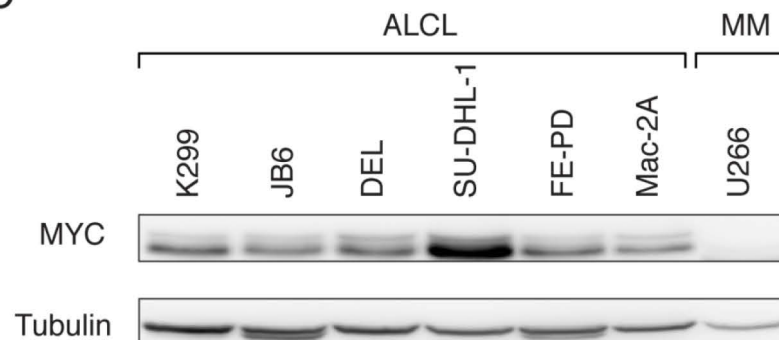


Abbildung 20: MYC-Expression bei ALCL-Patientenproben und Zelllinien. A) MYC-positive ALCL-Patientenprobe (links) und MYC-negative ALCL-Patientenprobe (rechts); (Vergrößerung 320x). B) Expression von IRF4 bei ALK+ und ALK- ALCL-Patientenproben (oben); Expression von IRF4 bei allen untersuchten ALCL-Patientenproben (unten) C) Mittels Immuno-Blot wurde bestätigt, dass die untersuchten ALCL-Zelllinien MYC unterschiedlich stark exprimieren; die MM-Zelllinie U266 diente als Negativkontrolle.

Bei den ALK-positiven ALCL-Zelllinien K299 und DEL, sowie den ALK-negativen ALCL-Zelllinien FE-PD und Mac-2A konnte eine shRNA-induzierte Herunterregulation von MYC gezeigt werden (Abbildung 21).

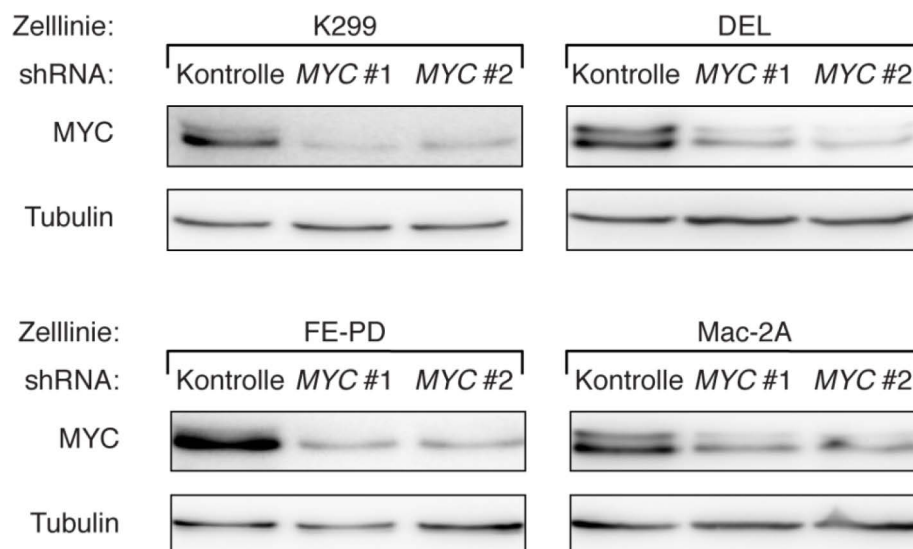


Abbildung 21: shRNA-vermittelte Herunterregulation von MYC auf Proteinebene. Mittels Immuno-Blot wurde bestätigt, dass beide verwendeten shRNAs nach 96h zu einer Herunterregulation von MYC bei den verwendeten ALCL-Zelllinien führten.

Um zu überprüfen, ob die Herunterregulation von *MYC* einen Einfluss auf die Viabilität der ALCL-Zelllinien hat, verglichen wir über einen Zeitraum von zwölf Tagen das Verhältnis von shRNA-positiven (GFP-positiven) zu shRNA-negativen Zellen. Es zeigte sich, dass die shRNAs gegen *MYC* bei allen untersuchten ALCL-Zelllinien Zytotoxizität induzierten (Abbildung 22).

Zur Bestätigung der Spezifität der verwendeten *MYC*-shRNAs, wurden anschließend die ALCL-Zelllinien DEL, JB6 und FE-PD mit einer *MYC*-cDNA transduziert, um ein so genanntes *Rescue*-Experiment durchzuführen. Diese exogene Expression der *MYC*-cDNA verhinderte den toxischen Phänotyp, der durch die *MYC*-shRNAs induziert wurde, sowohl bei ALK-positiven, als auch bei ALK-negativen ALCL-Zelllinien (Abbildung 23).

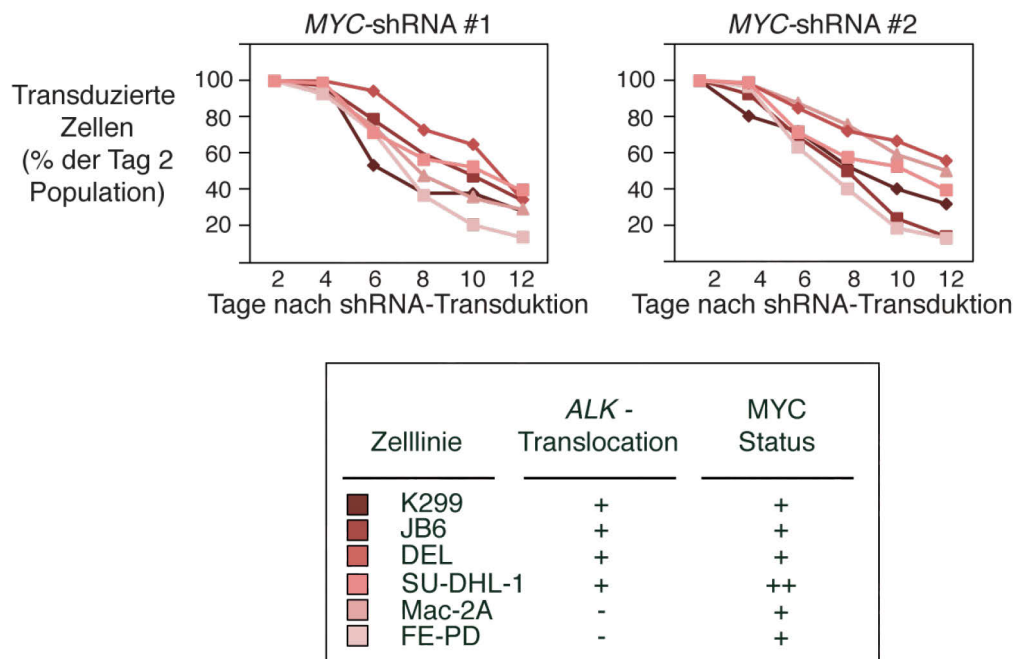


Abbildung 22: ALCL-Zelllinien sind abhängig von der MYC-Expression. Unabhängig des ALK-Status zeigen alle ALCL-Zelllinien einen toxischen Phänotyp nach Herunterregulation der MYC-mRNA-Expression mit zwei unterschiedlichen shRNAs.

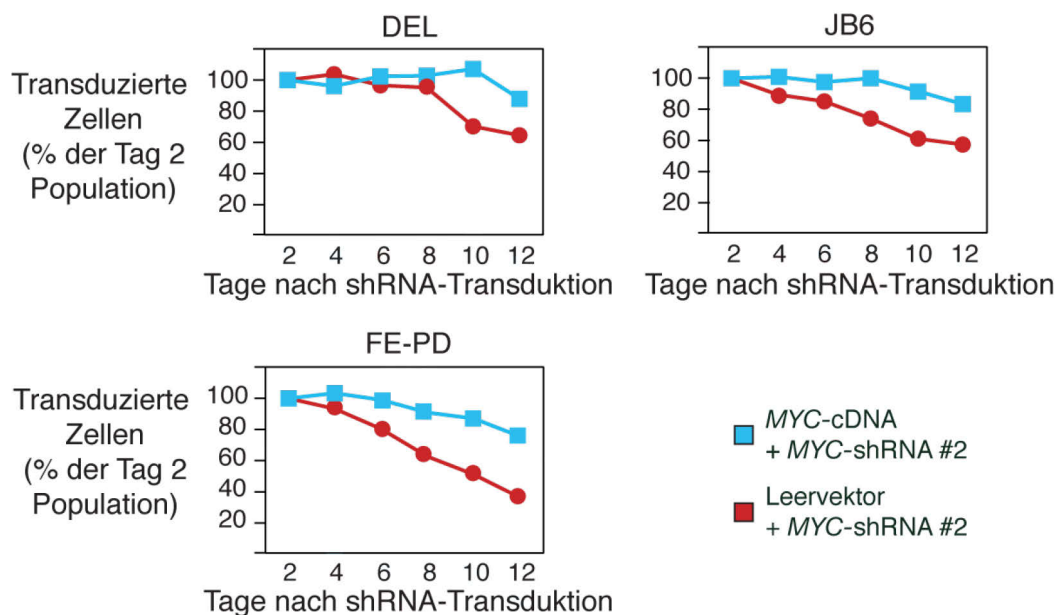


Abbildung 23: Die Expression der MYC-cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen MYC. Durch die Ko-Expression der MYC-cDNA wird die Zytotoxizität einer 3'UTR bindenden shRNA verhindert (blau).

Abschließend untersuchten wir, ob bei ALCL-Zelllinien über die exogene Expression der MYC-cDNA ebenfalls die Zytotoxizität der *IRF4*-shRNA unterbunden werden konnte. Hierfür wurden gleichzeitig exogene MYC-cDNA und eine zytotoxische

shRNA gegen *IRF4* bei den ALK-positiven Zelllinien DEL und JB6 sowie bei der ALK-negativen Zelllinie FE-PD exprimiert.

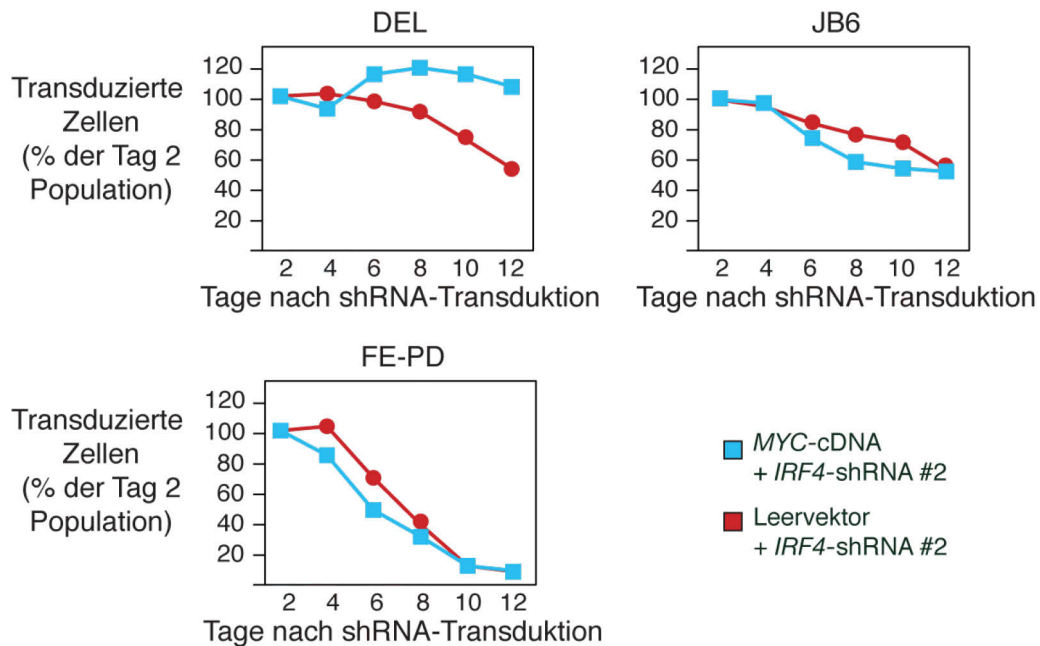


Abbildung 24: Die Expression der *MYC*-cDNA hemmt die Zytotoxizität der shRNA gegen *IRF4* bei der ALCL-Zelllinien DEL. Die Ko-Expression einer shRNA gegen *IRF4* und der *MYC*-cDNA führt zu einer Inhibierung der Zytotoxizität bei der ALCL-Zelllinie DEL, aber nicht bei den Zelllinien JB6 und FE-PD.

Die Ko-Expression der *MYC*-cDNA mit der *IRF4*-shRNA führte bei der ALK-positiven ALCL-Zelllinie DEL zu einer Inhibierung der shRNA-induzierten Zytotoxizität (Abbildung 24). Gleiches konnte jedoch nicht bei den Zelllinien JB6 und FE-PD erzielt werden. Hier zeigte sich trotz der *MYC*-cDNA Expression eine Zytotoxizität nach Herunterregulation von *IRF4*, vergleichbar mit den Zellen, die mit dem Leervektor infiziert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zytotoxizität der *IRF4*-shRNA bei den untersuchten ALCL-Zelllinien durch die Deregulation weiterer Signalwege induziert wird.

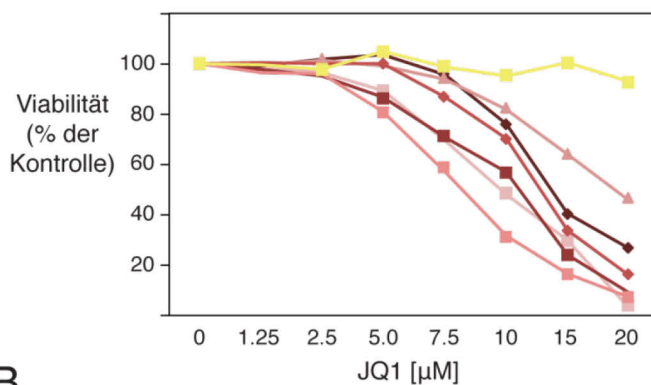
Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl bei ALCL-Patientenproben als auch bei ALCL-Zelllinien die Expression des Transkriptionsfaktors MYC nachgewiesen werden konnte. Eine Herunterregulation der *MYC*-Expression führte bei allen ALCL-Zelllinien

zu Zytotoxizität. Außerdem inhibierte die Expression der *MYC*-cDNA bei einer ALCL-Zelllinie die Zytotoxizität einer *IRF4*-shRNA.

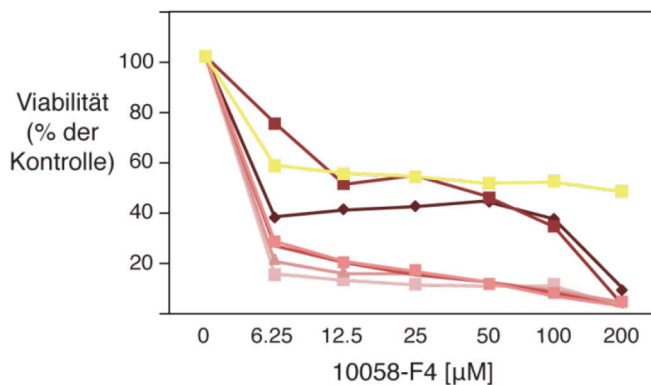
2.8 IRF4/MYC-Signalweg als potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten

Abschließend überprüften wir mit zwei Inhibitoren des MYC-Signalwegs, ob MYC eine potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten darstellt. Hierfür wurden die ALCL-Zelllinien (K299, JB6, DEL, SU-DHL-1, Mac-2A, FE-PD) für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des BET-Inhibitors JQ1, der die Expression des Transkriptionsfaktors MYC herunterreguliert, inkubiert.^{147,148} Unabhängig der ALK-Expression bewirkte der Inhibitor bei allen ALCL-Zelllinien eine signifikante Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 25A). Lediglich die L-MYC exprimierende MM-Zelllinie U266 zeigte keine Veränderung der Zellviabilität nach Behandlung mit JQ1. Zur Bestätigung dieses Erkenntnis nutzen wir einen weiteren pharmakologischen Inhibitor (10058-F4), der negativ auf die Heterodimerisierung des MYC-MAX-Komplexes und damit auf die Aktivität von MYC wirkt. Es zeigte sich erneut eine starke Änderung der Zellviabilität bei den untersuchten ALCL-Zelllinien, wobei wiederum bei der MYC-negativen Zelllinie U266 keine vergleichbar starke Veränderung der Viabilität gemessen werden konnte (Abbildung 25B).

A



B



Zelllinie	Lymphom Subtyp	MYC Status
K299	ALCL	+
JB6	ALCL	+
DEL	ALCL	+
SU-DHL-1	ALCL	++
Mac-2A	ALCL	+
FE-PD	ALCL	+
U266	MM	-

Abbildung 25: MYC-Inhibierung bei ALCL-Zelllinien. Die Inkubation der ALCL-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen des A) BET-Inhibitors JQ1 und des B) Inhibitors 10058-F4 reduzierte die Viabilität MYC-abhängiger ALCL-Zelllinien. Die Viabilität der MYC-unabhängigen MM-Zelllinie U266 blieb im Vergleich weniger stark beeinflusst.

Diese Daten suggerieren eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors MYC bei der molekularen Pathogenese des anaplastisch-großzelligen Lymphoms und zeigen gleichzeitig, dass eine Inhibierung des MYC-Signalwegs ein potentiell pharmakologisches Ziel für die zukünftige Behandlung von ALCL-Patienten sein kann.

3 DISKUSSION

3.1 IRF4 als Biomarker des anaplastisch-großzelligen Lymphoms

Die Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 bei der Pathogenese des ALCL war zu Beginn dieser Arbeit unzureichend untersucht. Im Rahmen mehrerer kleinerer Studien konnte gezeigt werden, dass ALCLs in der Regel IRF4 exprimieren. Unabhängig des ALCL-Subtyps wurde bei keiner der Studien ein Anteil von 80% IRF4-positiver ALCL-Patientenproben unterschritten. Im Vergleich dazu exprimierten andere periphere T-Zell-Lymphome signifikant weniger IRF4.¹²⁹⁻¹³¹

Um diese Daten an einer signifikant größeren Patientenkohorte zu bestätigen, färbten wir mittels IHC in enger Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Tzankov, Prof. Dr. Dirnhofer, Prof. Dr. Ott, Prof. Dr. Rosenwald, Prof. Dr. Hummel und Prof. Dr. Anagnostopoulos, 82 primäre ALCL-Patientenproben (Abbildung 5). Hiermit zeigten wir zu Beginn der vorliegenden Arbeit, dass 75/82 (91%) der ALCL-Patientenproben positiv auf die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 gefärbt werden konnten. Die Expression von IRF4 konnte bei beiden ALCL-Subtypen gezeigt werden. Interessanterweise unterschieden sich hierbei ALK-positive mit 32/38 (84%) von ALK-negativen 43/44 (98%) ALCLs signifikant bei der Expression von IRF4.

Für die Untersuchung der molekularbiologischen Rolle von IRF4 bei der Pathogenese des ALCL setzten wir anschließend etablierte ALCL-Zelllinien ein. Diese Zelllinien sind humanen Ursprungs, wurden aus primären Tumorzellen rezidivierter ALCL-Patienten isoliert und spiegeln damit generell die genetische

Konstitution des ALCL wieder. Bei dieser Arbeit dienten sie zur Vertiefung molekularbiologischer Untersuchungen, mit der Gewissheit, dass diese Zelllinien Klone einer einzelnen Tumorzelle repräsentieren und dabei unter Umständen nur partiell die Heterogenität eines primären Tumors widerspiegeln, der zusätzlich in konstanter Interaktion mit seiner Umgebung und dem Immunsystem des Patienten steht. Gleichzeitig bieten humane Zelllinien ein standardisiertes *in vitro*-Modell, das für die Untersuchung biochemischer und molekularbiologischer Zusammenhänge in der Wissenschaft akzeptiert und etabliert ist.¹⁴⁹

Hierfür musste zu Beginn der vorliegenden Arbeit gewährleistet sein, dass dieses *in vitro*-Modell die initialen *in vivo*-Erkenntnisse der signifikanten Überexpression des Transkriptionsfaktors IRF4 bei den untersuchten ALCL-Patientenproben bestätigt.

Dies konnte mittels quantitativer RT-PCR auf Ebene der mRNA-Expression von *IRF4* bestätigt werden (Abbildung 7). Es konnte unabhängig des ALCL-Subtyps bei fast allen ALCL-Zelllinien eine im Vergleich starke, aber heterogene Expression von IRF4 gezeigt werden. Hierbei fungierte die MM-Zelllinie H929 als Positivkontrolle. Diese Zelllinie diente bereits in einer vorangegangenen Studie als *in vitro*-Modell bei der Untersuchung der molekularbiologischen Rolle von IRF4 bei der Pathogenese des MM.¹²⁷ Die *IRF4*-negativen T-ALL-Zelllinien Jurkat und KE-37, sowie die SS-Zelllinie HuT 78 wurden als weitere Kontrollen verwendet, um die Spezifität der mRNA-Sonde zu bestätigen.

Diese Ergebnisse wurden zusätzlich auf Ebene der Proteinexpression verifiziert. Es zeigte sich erneut eine heterogene Expression von IRF4 bei den untersuchten ALCL-Zelllinien (Abbildung 8), wobei die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 eine sehr geringe Expression von IRF4 zeigte und damit bei den weiteren Untersuchungen als ein IRF4-negatives ALCL klassifiziert wurde.

Zusammenfassend bestätigte diese phänotypische Übereinstimmung mit den Erkenntnissen der initialen IHC-Färbungen, dass die hier verwendeten ALCL-Zelllinien als geeignete Modelle für die Untersuchung der Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 bei der Pathogenese des ALCL dienen.

3.2 IRF4 als Achillesferse des ALCL

Ältere Studien untersuchten bereits die molekularbiologische Ursache der starken IRF4-Expression beim ALCL und zeigten, dass bei ALK-positiven ALCLs die Expression von *IRF4* über die NPM-ALK-Signalkaskade reguliert wird. Hierbei wurden die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 als Regulatoren identifiziert, die über NPM-ALK und Interleukin-2 stimuliert werden.¹⁴⁴ Diese Erkenntnisse konnten wir nach der Inkubation von ALK-positiven ALCL-Zelllinien mit Crizotinib, einem etablierten Inhibitor der ALK-Tyrosinkinase, bestätigen (Abbildung 19). Interessanterweise exprimierten 16% (6/38) der ALK-positiven ALCL-Patientenproben kein IRF4, was ebenfalls bei der Zelllinie SU-DHL-1 gezeigt werden konnte. Hierbei bleibt zu überprüfen, ob der JAK/STAT-Signalweg die einzige Signalkaskade ist, deren Aktivität zur Expression von IRF4 durch NPM-ALK führt und ob hier bei ALK-positiven aber IRF4-negativen ALCL-Patientenproben dieser Signalweg auf Grund von Mutationen oder anderer molekularbiologischer Mechanismen gestört ist. Gleichzeitig verdeutlichen diese Daten die Komplexität des ALCL und zeigen ebenfalls, dass IRF4 als Transkriptionsfaktor bei einer kleineren Kohorte ALK-positiver ALCL-Patienten nicht obligat für das Wachstum und die Proliferation eines ALCL ist.

Beim ALK-negativen ALCL ist die molekularbiologische Ursache der starken IRF4-Expression weiterhin ungenügend verstanden. Eine neue Studie zeigt, dass bei

beiden ALCL-Subtypen der alternative NF- κ B-Signalweg potentiell über den Tumormarker CD30 aktiviert wird. Anschließend binden die Transkriptionsfaktoren p52 und RelB im Promotor des *IRF4*-Gens und steigern hierdurch die Expression von *IRF4*.⁷² Abschließend ist IRF4 als Transkriptionsfaktor direkt an der Expression der *CD30*-mRNA beteiligt.⁷² Über diesen Rückkopplungsmechanismus reguliert IRF4 positiv seine eigene Expression (Abbildung 26).

Bei weiteren Studien konnten speziell in Tumorproben ALK-negativer ALCL-Patienten somatische Mutationen und Fusionsproteine identifiziert werden, die zu einer Aktivierung des onkogenen JAK/STAT-Signalwegs führen, der wie auch bei ALK-positiven ALCL entscheidend zur Expression von IRF4 beitragen kann (Abbildung 26).^{73,150}

Für die funktionelle Untersuchung von IRF4 beim ALCL bedienten wir uns der Methode der RNA-Interferenz, um mittels shRNAs die *IRF4*-mRNA signifikant herunter zu regulieren (Abbildung 9).¹³⁹

Über den Verlauf von zwölf Tagen induzierte diese Herunterregulation in unserem *in vitro*-Modell bei allen IRF4-exprimierenden ALCL-Zelllinien Zytotoxizität (Abbildung 11). Diese Beobachtung war unabhängig von der Expression eines ALK-Fusionsproteins und impliziert, dass die Expression von IRF4 einen entscheidenden Proliferationsvorteil bei ALCL-Zelllinien darstellt. Bei der Translation in ein *in vivo*-Modell konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von *IRF4* das Tumorwachstum beim ALCL-Xenograft-Modell signifikant reduzierte (Abbildung 13).

Diese Daten legen nahe, dass *IRF4* beim ALCL als Onkogen fungiert und wie bereits bei verschiedenen aggressiven B-Zell-Lymphomen gezeigt, einen entscheidenden Überlebensfaktor für die Zellteilung und das Wachstum darstellt.^{127,135,136}

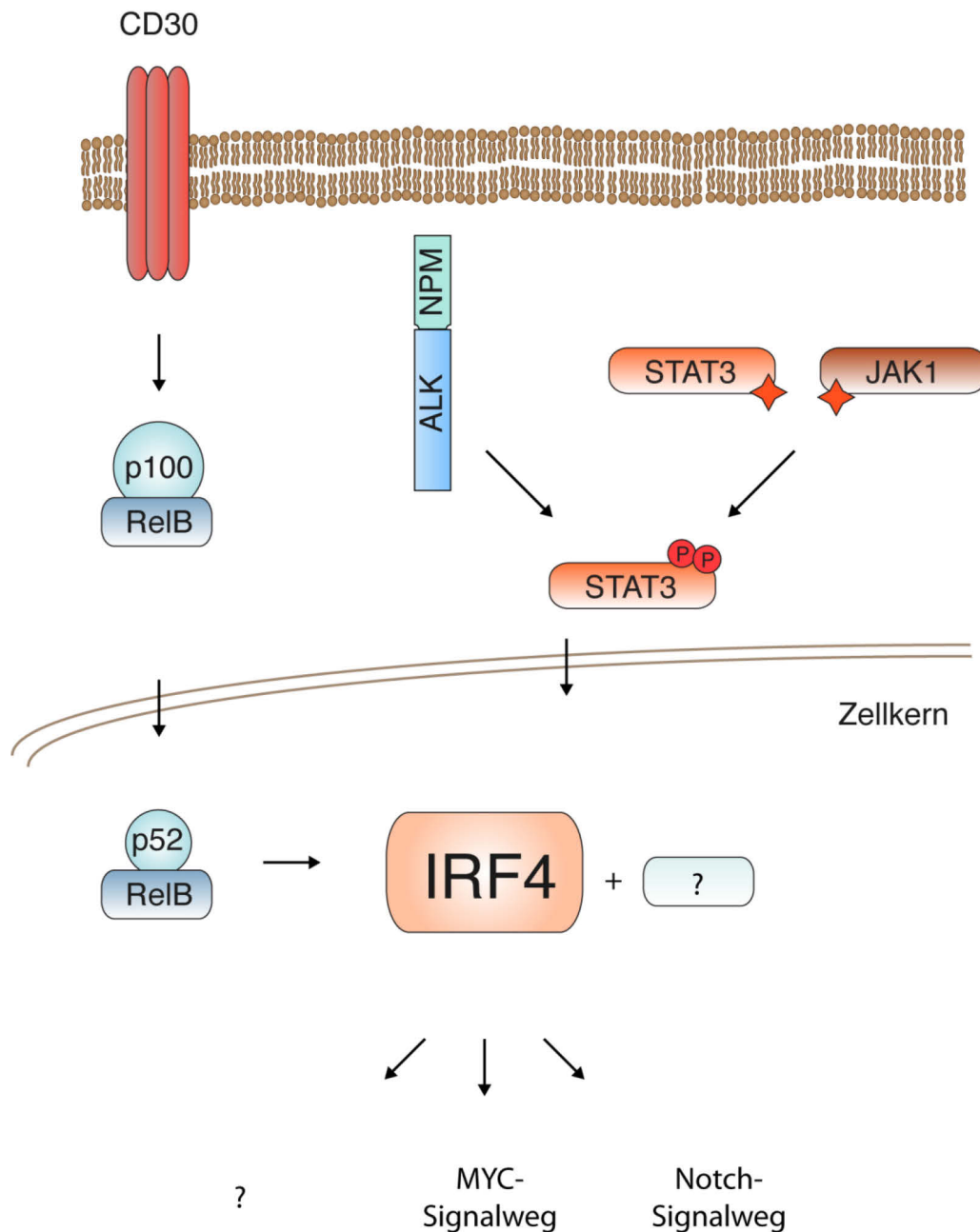


Abbildung 26: Ursachen der IRF4-Expression beim ALCL. Die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 kann beim ALCL über verschiedene Wege dereguliert sein. CD30 induziert die Aktivität des alternativen NF- κ B Signalwegs, der anschließend die IRF4-Expression induziert. Über einen Rückkopplungsmechanismus steigert IRF4 anschließend die Expression von CD30. Zusätzlich aktivieren sowohl das Fusionsprotein NPM-ALK als auch aktivierende Mutationen im JAK/STAT-Signalweg die Phosphorylierung von STAT3; dies kann ebenfalls zu einer Expressionssteigerung von *IRF4* führen. Welche onkogenen Signalwege neben MYC und Notch noch über IRF4 beim ALCL reguliert werden und ob diese Regulationen als Homo- oder Heterodimer geschehen, bleibt zunächst ungeklärt.

3.3 Molekularbiologische Grundlage der Abhängigkeit von IRF4 beim ALCL

Die in dieser Studie durchgeführte Genexpressionsanalyse nach Herunterregulation von *IRF4* und die systematische Analyse der signifikant hoch- und herunterregulierten Gene verdeutlichte die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors im Genexpressionsnetzwerk des ALCL (Abbildung 14). Es konnte die Deregulation mehrerer Gene kritischer zellulärer Prozesse festgestellt werden. So zeigte sich eine signifikante Hochregulation der mRNAs von *CDKN1A* und *CDKN2D*, welche für die Proteine der bekannten Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren p21^{Cip1} und p19 codieren. Diese Proteine spielen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus. Hierbei ist besonders die Funktion von p21^{Cip1} bei verschiedenen onkologischen Entitäten gut verstanden.¹⁵¹ Intrazellulär vermittelt p21^{Cip1} biologische Aktivität über die Bindung und Inhibierung von CDK1 und CDK2, was in einem Wachstumsstillstand resultiert.^{151,152} Zusätzlich kann p21^{Cip1} über die Inhibierung des *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* zu einer Hemmung der DNA-Synthese und der DNA-Reparatur führen.^{153,154} Über die *ATM*-mRNA konnte die Hochregulation des Gens eines weiteren mit der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle assoziierten Proteins identifiziert werden.^{155,156} Interessanterweise ist der Verlust der ATM-Aktivität über verändernde Mutationen essentieller Aminosäuren oder Deletionen des Gens sehr eng mit verschiedenen onkologischen Entitäten verknüpft und steht z.B. bei der chronisch lymphatischen Leukämie für ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben.^{157,158}

Molekularbiologisch ist die Expression der beschriebenen *CDKN1A*- und *ATM*-mRNA sehr eng mit dem onkogenen Transkriptionsfaktor MYC assoziiert. So konnte in

einem Mausmodell gezeigt werden, dass, bei gleichzeitiger Überexpression von MYC, inaktiviertes ATM Apoptose supprimiert und die Tumorgenese beschleunigt wird.¹⁵⁸ Zusätzlich zeigten weitere Studien, dass MYC als Transkriptionsfaktor die Expression von *CDKN1A* reguliert. Hierbei zeigten Untersuchungen verschiedener onkologischer Entitäten, dass die MYC-induzierte Expressionshemmung von *CDKN1A* Proliferation fördert und den von p21^{Cip1} induzierten Zellzyklusarrest inhibiert.^{159,160}

Unsere anschließende *Gene Set Enrichment*-Analyse mit Hilfe bereits beschriebener Genexpressionssignaturen untermauerte die globale Deregulation weiterer MYC-assoziiierter Gene nach Herunterregulation von IRF4 bei ALCL-Zelllinien (Abbildung 15, Anhang: Tabelle7). Hierbei konnten mehrere signifikant herunterregulierte Gensignaturen identifiziert werden, die unabhängig voneinander z.B. über die gezielte Überexpression von MYC, verschiedene MYC-regulierte Gene beschreiben.^{161,162}

Der onkogene Transkriptionsfaktor MYC ist als universeller Verstärker der Genexpression bekannt. Hierbei ist dessen Rolle bei der Förderung der Proliferation, der Proteinbiosynthese, des Zellwachstums und der metabolischen Aktivität besonders gut untersucht und stellt MYC häufig in eine zentrale Position bei zahlreichen onkologischen Erkrankungen.¹⁶³ Dabei konnten neben Amplifikationen und Translokationen des *MYC*-Lokus weitere Ursachen identifiziert werden, die entscheidend zur Überexpression von MYC beitragen.¹⁶⁴ Verschiedene Translokationen bringen z.B. beim sehr gut untersuchten Burkitt-Lymphom *MYC* unter die Kontrolle der Promotoren der *Ig*-Gene.¹⁶⁵ Die daraus resultierende Überexpression von MYC konnte als ein entscheidender Faktor der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms beschrieben werden.¹⁴⁸

Die molekularbiologische Implikation von MYC bei der Pathogenese des ALCL wurde bisher unzureichend untersucht. Eine ältere Studie beschreibt zwar die Expression von MYC bei CD30-positiven ALCL-Patientenproben, die in dieser Arbeit aus dem Jahr 1994 aber zum größten Teil als Proben mit einem B-Zell-Ursprung identifiziert wurden.¹⁶⁶ Zusätzlich beschreiben einige wenige Studien ALCL-Patienten mit MYC-Translokationen, die sich gleichzeitig über einen besonders aggressiven ALCL-Phänotyp auszeichnen.^{167,168} Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Erkenntnisse über die IRF4-abhängige Expression von *MYC* vermitteln einen weiteren Einblick in die MYC-Regulation beim ALCL. Hierbei konnte *MYC* zusätzlich als direktes Ziel von IRF4 beschrieben werden (Abbildung 18). Der molekularbiologische Zusammenhang zwischen der Expression von IRF4 und MYC ist bereits aus Untersuchungen beim MM bekannt, wobei hier ebenfalls ein Rückkopplungsmechanismus beschrieben ist, über den MYC zusätzlich die Expression von *IRF4* reguliert. Diesen Mechanismus konnten wir beim ALCL nicht bestätigen.¹²⁷ Andere onkologische Entitäten, wie das DLBCL und das HL, bei denen ebenfalls eine Abhängigkeit von der IRF4-Expression beschrieben wurde, zeigen im Gegensatz zum ALCL keinen Zusammenhang zwischen der Expression von IRF4 und MYC. Die Rolle von IRF4 ist bei diesen Entitäten sehr eng mit der Aktivität des NF-κB-Signalwegs verbunden.^{127,135,136}

Neben dem durch diese Arbeit belegten Zusammenhang zwischen der IRF4-Expression und MYC-assoziierten Genen beim ALCL, zeigte die *Gene Set Enrichment*-Analyse außerdem eine signifikante Deregulation von Genen, die mit dem Notch-Signalweg assoziiert werden (Anhang: Tabelle 7). Bei onkologischen Erkrankungen wie soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen ist die Deregulation des Notch-Signalwegs sowohl mit Tumorsuppression als auch mit einer Aktivierung

der Proliferation und Hemmung der Apoptose assoziiert.¹⁶⁹ Hier führen besonders bei der Förderung des Tumorwachstums aktivierende Mutationen von *NOTCH1* und *NOTCH2* zur Deregulation essentieller Signalwege.¹⁷⁰ Hierbei weisen mit 50 - 60% besonders Proben von T-ALL-Patienten eine sehr hohe Mutationsrate von *NOTCH1* auf.¹⁷¹ Zusätzlich konnten aktivierende Mutationen bei ca. 8% aller DLBCL- (*NOTCH2*) und Burkitt-Lymphom-Patienten (*NOTCH1*) beschrieben werden.^{172,173}

Eine neue Studie untersuchte die Aktivität des Notch-Signalwegs beim ALCL und zeigte, dass 68% (13/19) der ALCL-Patientenproben mittels IHC positiv auf die Expression von Notch1 gefärbt werden konnten. Ein Zusammenhang mit potentiellen Mutationen von *NOTCH1* oder *NOTCH2* konnte jedoch nicht gezeigt werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die pharmakologische Inhibierung des Notch-Signalwegs über die Inkubation mit einem β -Sekretase-Inhibitor zu zytotoxischen Effekten im ALCL-Zelllinienmodell führt.¹⁷⁴ Interessanterweise verweisen zusätzlich mehrere Studien auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von MYC und dem Notch-Signalweg beim T-ALL.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Inwieweit hierbei IRF4 als Transkriptionsfaktor an einer eventuell Notch-abhängigen Regulation von MYC beteiligt ist bleibt zu untersuchen. Dies eröffnet gleichzeitig mehrere Möglichkeiten und Ansätze für potentielle therapeutische Zielstrukturen beim ALCL.

3.4 MYC als potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten

Die vorliegende Arbeit verdeutlichte die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors IRF4 im Genexpressionsnetzwerk des ALCL. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von IRF4 essentiell für die Proliferation von ALCL-Zelllinien ist und dass eine Herunterregulation von IRF4 einen direkten Einfluss auf die Expression des

onkogenen Transkriptionsfaktors MYC hat (Abbildung 17). Weiter konnte gezeigt werden, dass MYC bei 84% der untersuchten ALCL-Patientenproben und bei allen vorhandenen ALCL-Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 20). Zusätzlich konnte eine signifikante Ko-Expression von MYC und IRF4 gezeigt werden. Eine direkte und signifikante Herunterregulation der *MYC*-mRNA verdeutlichte schließlich, dass die Expression von MYC einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation von ALCL-Zelllinien hat (Abbildung 22). Aufgrund dieser Resultate erfolgte bei den ALCL-Zelllinien die pharmakologische MYC-Inhibierung durch JQ1. JQ1 ist ein Inhibitor des Bromodomänen-Proteins BRD4, welches eine entscheidende Rolle bei epigenetischen Prozessen wie der DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen spielt.¹⁷⁸ Der Zusammenhang zwischen BRD4 und der Expression von MYC wurde zuerst bei der akuten myeloischen Leukämie beschrieben. Hier führte die RNA-Interferenz-vermittelte Herunterregulation der *BRD4*-mRNA zusätzlich zu einer Expressionsverringerung von *MYC*. Dieselbe Studie zeigte ergänzend, dass JQ1 als pharmakologischer Inhibitor von BRD4 bei dieser onkologischen Entität ebenfalls die Herunterregulation von MYC auf Protein- und RNA-Ebene induziert.¹⁷⁹

Unabhängig des ALCL-Subtyps führte die Inkubation aller ALCL-Zelllinien mit JQ1 im mikromolaren Konzentrationsbereich zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität (Abbildung 25). Interessanterweise führte bei einer früheren Studie an MM-Zelllinien die Verwendung von JQ1 zu vergleichbaren Ergebnissen. Hierbei zeigten anschließende Genexpressionsanalysen eine signifikante Deregulation MYC-assoziiierter Gene, welche wiederum bei der vorgestellten Arbeit über die Herunterregulation von *IRF4* beim ALCL signifikant dereguliert waren.^{147,180}

Diese Daten prädestinieren MYC als potentielle therapeutische Zielstruktur bei ALCL-Patienten und veranschaulichen, dass MYC-Inhibitoren in klinischen Studien

hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei ALCL-Patienten eingesetzt werden könnten, um hiermit eine Behandlungsalternative zur aggressiven Chemotherapie oder zur Behandlung von bisher refraktären oder rezidivierenden ALK-positiven und ALK-negativen ALCL-Patienten zu schaffen.

Klinisch erfolgt die Erstlinientherapie bei ALCL-Patienten in den meisten Fällen über eine Chemotherapie, die Anthracyclin enthält.¹⁸¹ Das Ansprechen von Patienten mit ALK-positivem ALCL ist hierbei signifikant besser. Eine retrospektive Analyse vorhandener klinischer Studien zeigte ein progressionsfreies Überleben acht Jahre nach Behandlungsbeginn von 72% bei ALK-positiven und lediglich 39% bei ALK-negativen ALCL-Patienten, mit einer absoluten Überlebensrate von 82% (ALK-positiv) und 49% (ALK-negativ).¹⁸² 22% der ALK-positiven und 34% der ALK-negativen ALCL erlitten hierbei ein Rezidiv.¹⁸²

Diese Daten verweisen auf die Notwendigkeit neuer therapeutischer Strategien. Die in dieser Arbeit verdeutlichte Rolle von IRF4 bei der Pathogenese des ALCL und die damit beschriebene Abhängigkeit von IRF4 und dem onkogenen Transkriptionsfaktor MYC könnte über Bromodomänen-Protein-Inhibitoren targetiert werden. Hierfür befinden sich mit *OTX015* von Merck und *CPI-0610* von *Constellation Pharmaceuticals* die ersten Inhibitoren in der Vorbereitung von Phase-I Studien für Patienten mit verschiedenen Lymphomen oder Leukämien.^{183,184} Erste präklinische Studien zeigen das Potential dieser Inhibitoren und schüren die Hoffnung, dass in naher Zukunft zielgerichtete Therapien die aggressive Chemotherapie ersetzen können.¹⁸⁴

3.5 Perspektive

Mit der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese des ALCL gewonnen. Eine bisher vernachlässigte molekularbiologische Untersuchung des Transkriptionsfaktors IRF4 verdeutlichte dessen zentrale Rolle im Genexpressionsnetzwerk dieses peripheren T-Zell-Lymphoms. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit mit dem Onkogen *MYC* ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert werden, dessen Expression ebenfalls essentiell für die Viabilität beim ALCL-Zelllinienmodell ist. Diese neuen molekularbiologischen Erkenntnisse über beide Transkriptionsfaktoren bei der Pathogenese des ALCL und deren signifikante Expression bei ALCL-Patientenproben eröffnen neue Möglichkeiten für die Routinediagnostik und werden die damit einhergehende Entwicklung spezifischer Signalweginhibitoren vorantreiben, in der Hoffnung, die bereits bestehende chemotherapeutische Standardtherapie um diese Inhibitoren zu erweitern.

Die Notwendigkeit dieser Weiterentwicklungen wird durch die Zahl der vielen rezidivierenden ALCL-Patienten gerechtfertigt, deren Behandlung mit der chemotherapeutischen Standardtherapie keine Erfolge erzielt. So werden zukünftige Studien zur weiteren Aufklärung onkogener Signalkaskaden bei malignen Lymphomen beitragen, um gezielt über die Inhibition essentieller Signalwege Einfluss auf das Tumorstadium nehmen zu können und durch eine zielgerichtete Behandlung der Patienten die aggressive Chemotherapie schonender gestalten und die Überlebensraten signifikant verbessern zu können.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien

Produkt	Hersteller
10058-F4	Selleck Chemicals
Adhesive PCR Plate Foils	Life Technologies
Ampicillin	Sigma Aldrich
APS	Roth
B2M-Sonde Hs00984230_m1	Life Technologies
BamHI-HF®	NEB
BCA Protein Assay	Thermo Scientific
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences
BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences
BglII	NEB
Biocoll	Biochrome
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Chromatography Paper 3mm	Whatman
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Conical Centrifuge Tubes 15/50ml	Falcon
Crizotinib	Pfizer
Desoxycholsäure Natriumsalz	Roth
Dimethylsulfoxid	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
DISCARDIT II Spritze - 10ml	BD Biosciences
DMEM, high glucose	Life Technologies
DNA Gel Loading Dye (6X)	Life Technologies
dNTP Mix (10mM each)	Life Technologies
Doxycyclin	Sigma Aldrich
Dynabeads Protein A	Life Technologies
Dynabeads Protein G	Life Technologies
EcoRI-HF®	NEB
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol, 99%	Roth
Ethidiumbromid-Lösung	Roth
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies

Produkt

Hersteller

Filtropur S 0.45µm
 Formaldehyd 35%
 Futtermittel für Ratten und Mäuse
 GeneRuler 1 kb DNA Ladder
 Gestopfte Pipettenspitzen 10/20/200/1000
 Glycin PUFFERAN®, min. 99 %
 HEPES PUFFERAN® ≥99,5 %
 Hexadimethrinebromid ≥94%
 HindIII-HF®
 Humanes Plasma (HP)
 IMDM Medium
 Immobilon Membrane, PVDF, 0.45µm
 IRF4-(M-17)- Antikörper
 IRF4-Antikörper (4964)
 IRF4-Sonde Hs01056533_m1
 JQ1
 Kaliumchlorid
 Kaliumdihydrogenphosphat
 LB-Agar (Luria/Miller)
 LB-Medium
 LE-Agarose
 Lipofectamine® 2000
 Lumi-Light Western Blotting Substrate
 Magermilchpulver
 Methanol, 99%
 MicroAmp® Fast Optical 96-Well
 MicroWell Polystyrene White Plates
 Mouse IgG, HRP-linked Antikörper
 MYC-Antikörper (Y69)
 MYC-Sonde Hs00153408_m1
 Natriumazid
 Natriumchlorid
 Normal goat IgG
 NSG-Mäuse
 Opti-MEM I Reduced Serum Medium
 PageRuler Prestained Protein Ladder
 PBS, pH 7.4
 Penicillin/Streptomycin
 Petrischale 92x16mm m. Nocken
 PhoshoSafe™ Extraction Reagent
 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase
 Propidiumiodid ≥94%
 Proteinase K
 Puromycindihydrochlorid
 Rabbit IgG, HRP-linked-Antikörper

Sarstedt
 Sigma Aldrich
 ssniff
 Life Technologies
 Sarstedt
 Roth
 Roth
 Sigma Aldrich
 NEB
 DRK
 Life Technologies
 Millipore
 Santa Cruz
 Cell Signaling
 Life Technologies
 Selleck Chemicals
 Roth
 Roth
 Roth
 Roth
 Biozym
 Life Technologies
 Roche
 Sucofin
 Roth
 Life Technologies
 Nunc
 Southern Biotec
 Abcam
 Life Technologies
 Merck
 Roth
 Santa Cruz
 Jackson Laboratory
 Life Technologies
 Life Technologies
 Life Technologies
 Biochrome
 Sarstedt
 Millipore
 NEB
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Sigma Aldrich
 Southern Biotec

Produkt

Reaktionsgefäß 1,5/2,0ml
 RNase A (20 mg/mL)
 Rotiphorese Gel 40
 Round Bottom Polystyrene Tube 5ml
 RPMI 1640 Medium, GlutaMAX Supplement
 SDS Pellets, min. 99 %
 Serologische Pipetten 1/2/5/10/25ml
 T4 DNA Ligase
 Taq Polymerase S
 TaqMan Gene Expression Master Mix
 TEMED
 TRIS PUFFERAN®, min. 99%
 Triton® X 100
 Trypsin-EDTA (0.05%)
 Tubulin Antikörper (DM1A)
 Tween-20
 Ultra pure water
 XhoI
 Zellkulturflaschen 25cm/75cm
 Zellkulturplatten 6-/12-/24-/48-/96-Well
 β-Mercaptoethanol

Hersteller

Sarstedt
 Sigma Aldrich
 Roth
 Falcon
 Life Technologies
 Roth
 Sarstedt
 NEB
 Genaxxon BioScience
 Life Technologies
 Roth
 Roth
 Roth
 Life Technologies
 Sigma Aldrich
 US Biological
 Biochrome
 NEB
 Falcon
 Falcon
 Merck

4.2 Geräte

Gerät

Alphamager EC Gel Documentation
 Centrifuge 5424 R
 CO₂ Brutschrank Serie CB
 Consort Maxi EV265 Power Supply
 Eppendorf Research® plus 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl
 FACSCalibur™
 Heraeus® microbiological incubators
 Horizontal Gel Tank - AGT-3
 IKAMAG-RET-Magnetrührer
 Image Quant LAS 4000
 Inversmikroskope AE 20
 KS 4000i Control Incubating Shaker
 Kühlschrank Liebherr Profiline
 Mikrowelle
 Mini-PROTEAN Tetra Cell
 MJ Mini Thermal Cycler

Hersteller

Alpha Innotech
 Eppendorf
 Binder
 Hoefer
 Eppendorf
 BD Biosciences
 Thermo Scientific
 VWR
 IKA
 GE Healthcare
 Motic
 IKA
 Liebherr
 VWR
 Bio Rad
 Bio Rad

Gerät

NanoDrop™ 2000
 pH-Meter HI 2211-02
 Pico17 Centrifuge
 Pipetboy Accu
 Polymax 1040 - taumelnder Plattformschüttler
 Rollenmischer Stuart SRT6
 Rotanta 460R
 SONOPLUS HD2070
 StepOnePlus RT-PCR System
 Sterilbank MSC advantage
 ThermoServ 24 - Heizblock
 Tiefkühlschrank -20°C
 Tiefkühlschrank -80°C Forma 905
 VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader
 Vortex-Genie® 2
 Wasserbad 4l Julabo

Hersteller

Thermo Scientific
 Roth
 Thermo Scientific
 Integra
 Heidolph
 Stuart
 Hettich
 Bandelin
 Life Technologies
 Thermo Scientific
 Biotech Service Blu
 Siemens
 Thermo Scientific
 Perkin Elmer
 Scientific Industries
 Julabo

4.3 Kits

Produkt

ChIP DNA Clean & Concentrator™
 GeneAmp Gold RNA PCR Core Kit
 GeneJET PCR Purification Kit
 GeneJET Plasmid Miniprep Kit
 HumanHT-12 v4 BeadChip Kit
 Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit
 Nucleo Spin RNA II Kit
 NucleoBond Xtra Midi Kit
 QIAEX II Gel Extraction Kit

Hersteller

Zymo Research
 Life Technologies
 Life Technologies
 Life Technologies
 Illumina
 Illumina
 MACHEREY-NAGEL
 MACHEREY-NAGEL
 QIAGEN

4.4 Puffer

Blotting-Puffer

3,03g Tris
14,41g Glycin
200ml Ethanol
1000ml *Ad H₂O*

Sammelgel-Puffer

30,3g Tris
20ml 10% SDS
500ml *Ad H₂O*
pH 8,8

Laemmli-Ladepuffer

1,5ml β -Mercaptoethanol
1,5g SDS
0,015g Bromphenolblau
5,75ml Glycerin
10ml *Ad Sammelgel-Puffer*

SDS-Lauf-Puffer

3,02g Tris
14,4g Glycin
1g SDS
1000ml *Ad H₂O*

ChIP-Lysis-Puffer

50mM HEPES
150mM Natriumchlorid
1% Triton-X 100
0,1% Desoxycholsäure Natriumsalz
1mM EDTA

Trenngel-Puffer

90,9g Tris
20ml 10% SDS
500ml *Ad H₂O*
pH 6,8

ChIP-Lysis-Puffer (High Salt)

50mM HEPES
500mM Natriumchlorid
1% Triton-X 100
0,1% Desoxycholsäure Natriumsalz
1mM EDTA

TAE-Laufpuffer

4,84g Tris
5,72ml Eisessig
2ml 0,5M EDTA
1000ml *Ad H₂O*

PBS

159g Natriumchlorid
3g Kaliumchlorid
37,8g Di-Natriumhydrogenphosphat
4g Kaliumdihydrogenphosphat
2000ml *Ad H₂O*
pH 7,6

PBS-T

1000ml PBS
5ml Tween-20

4.5 Immunhistochemische Färbung von IRF4

Die immunhistochemische Färbung der 82 primären ALCL-Patientenproben erfolgte mit dem IRF4 Antikörper M7259 der Firma Dako. Hierfür wurde der Antikörper gegen IRF4 in PBS (1% BSA) 1:50 verdünnt und mit den Schnitten über Nacht bei 4°C inkubiert. Die vorangegangene Antigendemaskierung erfolgte durch Erhitzen der Schnitte auf 100°C für 30 Minuten in Citratpuffer (pH 6.0). Die Visualisierung des gebundenen Sekundärantikörpers gelang abschließend über einen Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB).¹⁸⁵ Die Detektion von MYC erfolgte, wie bereits beschrieben, über den Antikörperklon EP121 der Firma Epitomics, welcher 1:100 verdünnt wurde.¹⁸⁶ Für die Definition positiver- bzw. negativer-Patientenproben wurde anhand bereits publizierter Studien ein Grenzwert für die Expression von IRF4 und MYC von $\geq 30\%$ positiven Tumorzellen festgelegt.^{187,188}

4.6 Humane Zelllinien und Zellkulturmedien

Der Großteil der in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse basiert auf Untersuchungen an eukaryotischen Zelllinien, welche mittels retroviraler Transduktion genetisch modifiziert wurden. Diese modifizierten Zelllinien exprimieren einen murinen Rezeptor, der für die Transduktion mit einem ecotropen Vektor notwendig ist. Um zusätzlich eine induzierbare Expression der shRNAs oder exogener cDNA zu ermöglichen, wurden die Zelllinien in einem zweiten Verfahrensschritt mit einem bakteriellen Tetracyclin-Repressor versehen, der über die Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin deaktiviert wird, solange der verwendete retrovirale Vektor über einen *tet*-Operator verfügt.¹³⁹ Die Kultivierung dieser Zelllinien erfolgte bei konstanten 37°C und 5% CO₂. Die jeweiligen Kulturmedien wurden mit 10% fetalem Kälberserum

(FBS) oder 20% humanem Plasma (HP) sowie Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100mg/ml) supplementiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Humane Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Onkologische Entität	ALK-Status	Kulturmedium	Erstpublikation
K299	ALCL	+	RPMI + 10% FBS	<i>Fischer et al.</i> ¹⁸⁹
JB6	ALCL	+	RPMI + 10% FBS	<i>Kadin et al.</i> ¹⁹⁰
DEL	ALCL	+	IMDM + 20% HP	<i>Barbey et al.</i> ¹⁹¹
SU-DHL-1	ALCL	+	RPMI + 10% FBS	<i>Epstein et al.</i> ¹⁹²
FE-PD	ALCL	-	RPMI + 10% FBS	<i>Del Mistro et al.</i> ¹⁹³
Mac-2A	ALCL	-	IMDM + 20% HP	<i>Su et al.</i> ¹⁹⁴
HuT 78	Sézary-Syndrom	-	RPMI + 10% FBS	<i>Gazdar et al.</i> ¹⁹⁵
Jurkat	T-ALL	-	RPMI + 10% FBS	<i>Schneider et al.</i> ¹⁹⁶
KE-37	T-ALL	-	RPMI + 10% FBS	<i>Drexler et al.</i> ¹⁹⁷
H929	Multiples Myelom	-	RPMI + 10% FBS	<i>Gazdar et al.</i> ¹⁹⁸
U266	Multiples Myelom	-	IMDM + 20% HP	<i>Nilsson et al.</i> ¹⁹⁹

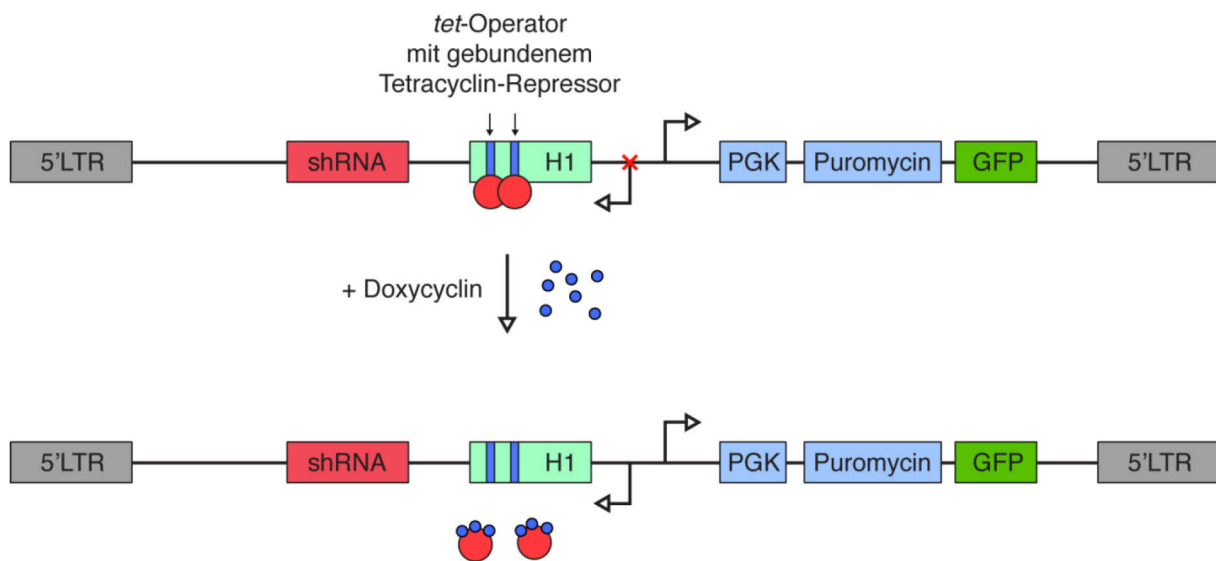
4.7 Retrovirale Vektoren

Für eine möglichst effektive shRNA- oder cDNA-Expression wurden die entsprechenden Konstrukte in die dafür etablierten retroviralen Vektoren kloniert (Abbildung 27). Hierfür stand zur Expression von shRNAs der pRSMX-Vektor zur Verfügung, der vom retroviralen pSUPER-Vektor abgeleitet ist.²⁰⁰ Die shRNA-Expression wird über den induzierbaren H1-RNA Polymerase III-Promotor gesteuert, welcher über einen *tet*-Operator reguliert werden kann.²⁰⁰ Der *tet*-Operator ermöglicht eine gezielte Expression der shRNA nach Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin. Zusätzlich befindet sich im pRSMX-Vektor eine über den PGK-Promotor gesteuerte Puromycin-Resistenz-GFP-Kassette, die konstitutiv aktiv ist. Diese ermöglicht zum einen die Bestimmung des retroviralen Transduktionserfolgs mit Hilfe eines Durchflusszytometers, zum anderen die Selektionierung der erfolgreich infizierten Zellen innerhalb einer heterogen infizierten Zellpopulation.¹³⁹

Die Expression einer cDNA erfolgte über ein retrovirales Expressionssystem, das vom Maus-Stammzellen-Virus (MSCV) abgeleitet ist. Anders als beim pRSMX-Vektor reguliert hierbei ein CMV-Promotor die Expression. Die Puromycin-Resistenz-Kassette wird, wie beim pRSMX-Vektor, ebenfalls über den PGK-Promotor gesteuert, ko-exprimiert aber kein grünes Fluoreszenzprotein.

Neben den beiden Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit zwei weitere retrovirale Vektoren verwendet, welche für die Produktion der zur Transduktion verwendeten Virionen benötigt werden. Diese beiden, auch „Helferplasmide“ genannten Vektoren, stellen die Expression der drei essenziellen Gene eines Retrovirus (*gag*, *pol* und *env*) sicher. Hierbei kodiert das Plasmid pHIT/EA6 für ein chimäres Envelope-Protein.²⁰¹ Des Weiteren wird über das Plasmid pHIT60 die Expression der Gene *gag* und *pol* sichergestellt, die u. a. für eine virale Protease und eine Reverse Transkriptase kodieren.^{202,203} Für die vollständige Produktion retroviraler Virionen ist es unabdingbar, dass beide Plasmide den virusproduzierenden Zellen zur Verfügung stehen.

pRSMX-Vektor



pMSCV-Vektor

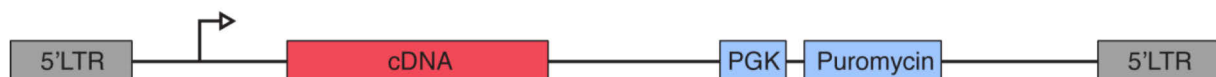


Abbildung 27: Retrovirale Expressionsvektoren zur Expression von shRNA- und cDNA-Konstrukten. Die Expression der shRNAs über den pRSMX-Vektor ist über den *tet*-Operator des H1-RNA Polymerase III-Promotors reguliert. In Abhängigkeit von Doxycyclin dissoziiert der Tetracyclin-Repressor und ermöglicht anschließend die Expression der shRNA. Die Expression der Puromycin-Resistenz-GFP-Kassette war konstitutiv aktiv. Die Expression der cDNA erfolgt über den pMSCV-Vektor und ist über den 5'LTR assoziierten Promotor gesteuert. Die LTR-Elemente ermöglichen die Integration der gewünschten Sequenzen in das Genom der Zielzellen.

4.8 Amplifikation retroviraler Vektoren

Die Amplifikation der verschiedenen Vektoren erfolgte in einem speziellen, chemisch kompetenten Stamm des *Escherichia coli* Bakteriums, der vom *K-12 DH10B* Stamm abgeleitet ist (*One Shot® TOP10*; Life Technologies). Nach dreißigminütiger Inkubation der Bakterien mit der zu transformierenden Plasmid-DNA auf Eis, erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C. Dem Hitzeschock folgte eine fünfminütige Regeneration, erneut auf Eis. Nach dieser kurzen Regeneration und der Zugabe von SOC-Medium erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Abschließend wurde die

Bakteriensuspension auf vorgewärmte LB-Agar-Platten ausgestrichen (10µg/ml Ampicillin) und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.9 Analyse von Nukleinsäuren

4.9.1 Extraktion amplifizierter Plasmid-DNA

Für die Amplifikation und Extraktion von Plasmid-DNA wurden einzelne, transformierte Bakterienkolonien über Nacht bei 37°C und 220 U/min in LB-Medium (10µg/ml Ampicillin) inkubiert. Die abschließende Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits*. Zur Bestimmung der Plasmidkonzentration wurde der *NanoDrop™ 2000* verwendet.

4.9.2 Extraktion eukaryotischer RNA

Die Extraktion eukaryotischer RNA folgte gemäß dem Protokoll des *Nucleo Spin RNA II Kits*. Hierfür wurden vorher kultivierte Zellen pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem *NanoDrop™ 2000*, abschließend wurde die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

4.9.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung amplifizierter DNA-Fragmente wurden 1%ige Agarosegele hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in TAE-Laufpuffer erhitzt. Zur späteren Visualisierung der einzelnen DNA-Fragmente wurde anschließend eine 1% Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen. Die zu untersuchenden Proben wurden, entsprechend ihres Volumens, mit dem Ladepuffer *DNA Gel Loading Dye (6X)* versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V

für 45min bis 2h. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurde zusätzlich zu den Proben der Größenstandard *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* aufgetragen.

Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpells gelöst und anschließend über das *QIAEX II Gel Extraction Kit* aufgereinigt.

4.9.4 Amplifikation und Klonierung von cDNA

Für die exogene Expression der *IRF4*-cDNA in humanen Zelllinien musste die cDNA des Transkriptionsfaktors aus dem RNA-Pool der Zelllinie K299 amplifiziert und in den pMSCV-Vektor kloniert werden. Die Extraktion der RNA erfolgte wie in 4.9.2 beschrieben. Anschließend wurde die RNA der Zelllinie mit Hilfe des *GeneAmp Gold RNA PCR Core Kits* zu cDNA amplifiziert, wobei das Protokoll des Herstellers keine Änderung erfuhr. Mit Hilfe der in Tabelle 2 dargestellten Amplifikationsprimer konnte anschließend die cDNA von *IRF4* aus dem cDNA-Pool der ALCL-Zelllinie K299 amplifiziert werden.

Tabelle 2: Amplifikationsprimer zur Klonierung der *IRF4*-cDNA

Primer-Name	Primer-Sequenz
<i>IRF4_cDNA_F</i>	CCCCCTCGAGGCCACCATGGATTACAAAGACGATGACGATAAAATGAACCTGG AGGGCGGCGG
<i>IRF4_cDNA_R</i>	CGCGGAATTCTCATTCTTGAATAGAGGAATGGC

Die verwendeten Primer fügten der cDNA zusätzlich einen FLAG-Tag und N- bzw. C-Terminale Schnittstellen für den gezielten Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI-HF*® und *XhoI* hinzu. Die Amplifikation erfolgte mit der *Phusion*® *High-Fidelity DNA Polymerase* bei 10 Amplifikationszyklen. Nach Aufreinigung des Amplifikats, wie in 4.9.3 beschrieben, wurden der pMSCV-Expressionsvektor und die amplifizierte cDNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI-HF*® und *XhoI* endonukleolytisch für 2h

bei 37°C im *CutSmart® Buffer* verdaut. Der abschließende Aufreinigungsschritt erfolgte nach dem Protokoll des *GeneJET PCR Purification Kits*. Für die Ligation der geschnittenen cDNA und des geschnittenen pMSCV-Vektors wurde die *T4 DNA Ligase* verwendet. Die Reaktion fand für eine Stunde bei Raumtemperatur statt. Die abschließende Transformation erfolgte wie in 4.8 beschrieben. Die erfolgreiche Klonierung wurde mit den Primern aus Tabelle 3 über die Sequenzierung der cDNA-Sequenz bestätigt.

Tabelle 3: Primer zur Sequenzierung der *IRF4*-cDNA

Primer-Name	Primer-Sequenz
<i>IRF4_seq_F1</i>	GGAAGCTCCGCCAGTGGCTG
<i>IRF4_seq_F2</i>	AGCAGTTCTTGTCAGAGCTG
<i>IRF4_seq_R1</i>	GCATCATGTAGTTGTGAACC

4.9.5 Klonierung von shRNAs

Die Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten shRNAs erfolgte in den bereits beschriebenen pRSMX-Vektor, der vom retroviralem pSUPER-Vektor abgeleitet ist. Zur Linearisierung des Vektors wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *HindIII* verdaut. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der shRNA-Oligonukleotid-Paare, deren Zielsequenzen in Tabelle 4 gezeigt sind, bei folgenden Temperaturen im *MJ Mini Thermal Cycler*:

1. 95°C für 2 min
2. 85°C für 9 min
3. 75°C für 9 min
4. 65°C für 9 min
5. 55°C für 9 min
6. 45°C für 9 min
7. 35°C für 9 min
8. 25°C für 10 min

Tabelle 4: Zielsequenzen der verwendeten shRNAs

Primer-Name	Zielsequenz
<i>IRF4_shRNA</i> #1	CCGCCATTCCTCTATTCAAGA
<i>IRF4_shRNA</i> #2	GTGCCATTTCTCAGGGAAGTA
<i>MYC_shRNA</i> #1	CGATTCCTTCTAACAGAAATG
<i>MYC_shRNA</i> #2	CCTATGAACTTGTTTCAAATG
<i>MSMO1_shRNA</i>	CTCTCAACCCTTTAAATCTGA

Wie in 4.9.4 wurde für die anschließende einstündige Ligation die *T4 DNA Ligase* verwendet und abschließend der Ligationsansatz in die *One Shot® TOP10* transformiert. Die erfolgreiche Klonierung der shRNA-Oligonukleotide in den pRSMX-Vektor wurde für jede verwendete shRNA per Sequenzierung bestätigt.

4.10 Retrovirale Transduktion humaner Zelllinien

4.10.1 Transfektion von 293T/CeB-Zellen

Neben den humanen Zelllinien aus 4.6 wurde in dieser Arbeit eine weitere eukaryotische Zelllinie verwendet, die 293T/CeB-Zellen.^{139,204,205} Hierbei handelt es sich um eine Variante der bekannten HEK-293-Zellen, welche zur Produktion der retroviralen Virionen eingesetzt wurden. Für die Kultivierung dieser adhärenenten Zellen wurde das Kulturmedium DMEM mit 10% FBS sowie Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100mg/ml) supplementiert.

Für die Virionenproduktion mussten die 293T/CeB-Zellen mit PBS gewaschen werden, um sämtliche Medium- und Supplementrückstände zu entfernen. Das Ablösen der adhärenenten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte unter Zugabe von Trypsin-EDTA (0.05%). Die gelösten Zellen wurde anschließend in Opti-MEM-Kulturmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml

eingestellt. Neben 1ml der Zellen vervollständigten 7µg des gewünschten retroviralen Expressionsplasmids, sowie jeweils 3µg der in 4.7 beschriebenen Helferplasmide pHIT60 und pHIT/EA6 und 10µl *Lipofectamine*® 2000 den insgesamt 3ml umfassenden Reaktionsansatz. Nach einer Inkubation von 4 - 5h bei 37°C und 5% CO₂ wurden abschließend 3ml DMEM-Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Nach 48h bzw. 72h wurde der Überstand abgenommen, der die produzierten Virionen enthielt und für die Transduktion der humanen Zelllinien verwendet werden konnte.

4.10.2 Transduktion humaner Zelllinien

Für die Transduktion der humanen Zelllinien wurden diese 24h vor Transduktion mit Zellkulturmedium versorgt, um zu erreichen, dass sich die Zellen in Proliferation befinden. Zu Beginn des Transduktionsprotokolls wurde der virionenhaltige Zellkulturüberstand der virusproduzierenden 293T/CeB-Zellen mit Hilfe eines Filtropur S Filters steril filtriert. Die anschließende Zugabe von Hexadimethrinbromid (1µg/ml) erhöht die Transduktionseffizienz bei humanen Zelllinien.²⁰⁶ Für die Transduktion wurden 1 - 3ml Virusüberstand verwendet, zu dem zusätzlich 0,3 - 0,5ml der Zielzellen gegeben wurde. Die Transduktion erfolgte in einer 12-Well-Zellkulturplatte und wurde in der *Rotanta 460R*-Zentrifuge durchgeführt. Dies geschah bei 90-minütiger Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 2500rpm bei Raumtemperatur, ohne Zentrifugationsbremse. Nach abgeschlossener Transduktion wurde zu den humanen Zelllinien 1ml des entsprechenden Kulturmediums gegeben. Nach einer zweitägigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte anhand der GFP-Expression der Erfolg der Transduktion am Durchflusszytometer bestimmt werden.

Um eine homogene Zellpopulation mit ausschließlich shRNA- bzw. cDNA transduzierten Zellen zu erhalten, bestand anschließend die Möglichkeit, die Zellen mit Hilfe des Antibiotikums Puromycin zu selektionieren. Wie bereits in 4.7

beschrieben enthalten alle shRNA- bzw. cDNA-exprimierenden Vektoren in dieser Arbeit ein konstitutiv aktives Puromycin-Resistenz-Gen, das den transduzierten Zellen ermöglicht einen Puromycin-induzierten Selektionsdruck zu überstehen. Die Selektionierung erfolgte für 24h bei einer Puromycinkonzentration von 20µg/ml. Der Erfolg der Selektionierung wurde abschließend am Durchflusszytometer ermittelt und die Zellen weiter kultiviert.

4.10.3 Expression von shRNAs und cDNA in humanen Zelllinien

Die Expression einer shRNA über den pRSMX-Vektor wird über die Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin stimuliert. Wie bereits in 4.6 beschrieben, waren die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien so modifiziert, dass sie einen bakteriellen Tetracyclin-Repressor exprimierten. Die Repressorproteine binden an den *tet*-Operator im H1-RNA Polymerase III-Promotor, der bei allen shRNA-exprimierenden retroviralen Vektoren vorhanden ist. Die Zugabe von Doxycyclin (40µg/ml) führt zu einer Dissoziation des Repressorproteins und somit zu einer Aktivierung der shRNA-Expression. Da das Antibiotikum eine Halbwertszeit von 15-25h hat, wurde dem Kulturmedium bei längeren Versuchsreihen nach zwei Tagen neues Doxycyclin zugeführt. Die Promotorregion des pMSCV-Vektors weist keinen *tet*-Operator auf, entsprechend musste für die Expression von cDNA-Konstrukten kein Doxycyclin hinzugegeben werden.

Für die beschriebenen Ko-Expressionsexperimente wurden die humanen Zelllinien sequenziell infiziert. Hier erfolgte zu Beginn eine Transduktion mit einem GFP-negativen, cDNA tragenden pMSCV-Vektor, gefolgt von einer Selektionierung mit dem Antibiotikum Puromycin. Anschließend wurden die cDNA exprimierenden Zellen mit dem GFP-positiven, shRNA exprimierenden pRSMX-Vektor infiziert.

4.11 Durchflusszytometrische Analyse transduzierter Zellen

Die durchflusszytometrische Analyse der shRNA-transduzierten Zellen erfolgte am *BD FACSCalibur* 48h nach Transduktion. Hierfür wurden 500µl der infizierten Zellen nach Pelletierung in 100µl einer PBS-Propidiumiodid-Lösung aufgenommen. Das Propidiumiodid (PI) wurde in einem Verhältnis 1:1000 mit PBS verdünnt. Zu Beginn der Messung wurde für jede Zelllinie im Forward- bzw. Side-Scatter die Zellpopulation der vitalen Zellen festgelegt. Nur diese wurden anschließend auf Signale im FL1-Kanal für das mit der shRNA ko-Exprimierte GFP und im FL2-Kanal für eine eventuelle Färbung des DNA-Markers PI untersucht. PI-positive Zellen gelten in der Regel als nicht vital und wurden aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Untersucht wurde anschließend das Verhältnis der GFP-positiven zur GFP-negativen Population. Dieses spiegelt innerhalb der untersuchten, vitalen Zellpopulation das Verhältnis der shRNA-exprimierenden zu den shRNA-negativen Zellen wieder. Im Verlauf von zwölf Messtagen wurde an jedem zweiten Tag dieses Verhältnis für jede der untersuchten shRNAs bestimmt, um Veränderungen des Verhältnisses der beiden Populationen zu analysieren. Wächst die Zellzahl der GFP-negativen Zellpopulation bei gleichzeitiger Zellzahlverringerung in der GFP-positiven Population, sprechen wir von einer Zytotoxizität der untersuchten shRNA. Die Ergebnisse wurden abschließend auf eine Kontroll-shRNA gegen *MSMO1* normalisiert, deren Expression bereits in mehreren publizierten Studien keinen Effekt auf verschiedene humane Zelllinien zeigte.^{146,207,208}

4.12 Xenograft-Mausmodell

Für das Xenograft-Mausmodell wurden sechs bis acht Wochen alte NSG-Mausweibchen verwendet. Diese immunsupprimierten Mäuse verfügen über keine B-, T- und NK-Zellen. Dies ermöglicht ein verbessertes Anwachsen artfremder Zellen bei einer Xenotransplantation.

Die ALK-positiven ALCL-Zelllinien JB6 und K299 wurden mit der shRNA #1 gegen die mRNA des Transkriptionsfaktors *IRF4* bzw. mit einer Kontroll-shRNA gegen *MSMO1* infiziert und selektioniert (wie in 4.10 beschrieben).

Jeweils 1×10^7 Zellen wurden pro Maus mit Matrigel™ vermischt und transplantiert. Bei der Zelllinie K299 umfasste der komplette Versuchsansatz 12 und bei JB6 sechs Mäuse. Fünf Tage nach der Transplantation konnten die ersten Tumore ertastet und gemessen werden, ab diesem Zeitpunkt wurde neben 5% Saccharose zusätzlich 1mg/ml Doxycyclin dem Trinkwasser beigemischt, um die Expression der jeweiligen shRNA zu induzieren. Die Bestimmung des Tumolvolumens erfolgte drei Mal pro Woche über folgende Formel: $\frac{1}{2} \times \text{Tumurlänge} \times \text{Tumorbreite}^2$. Vierzehn Tage nach der Transplantation wurde das Tumolvolumen das letzte Mal bestimmt und die Versuchsmäuse getötet, sowie Tumorproben für weitere Analysen gesammelt und bei -80°C gelagert.

4.13 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Versuche der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurden in enger Zusammenarbeit mit Ulduz Sobhiahshar an der Boğaziçi University, Istanbul, unter der Leitung von Prof. Dr. N. C. Tolga Emre durchgeführt. Für die Durchführung des Versuchs wurden 3×10^7 Zellen der ALCL-Zelllinien DEL und FE-PD verwendet.

Zur Fixierung von Proteinverbindungen wurden die Zellen mit einer 1%-igen Formaldehydlösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Vorgang wurde anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit einer 0,125M Glycinlösung unterbrochen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in ChIP-Lysis-Puffer aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend fand die Sonifizierung mit dreizehn Zyklen statt, wobei pro Zyklus eine Minute sonifiziert (Tastgrad 80%, Leistung 80%) und eine Minute pausiert wurde. Danach wurde das Lysat per Zentrifugation gewaschen und aliquotiert. Das Lysat von 5×10^6 Zellen wurde weiter verwendet (Input-Probe), mit der dreifachen Menge an ChIP-Lysis-Puffer aufgefüllt und 45 Minuten mit 50µl der magnetischen Protein G- und Protein A-Beads inkubiert, die vorher mit 5µg anti-IRF4 bzw. normalem Ziegen-IgG-Antikörper inkubiert wurden. Anschließend wurden die Beads mit ChIP-Lysis-Puffer, ChIP-Lysis-Puffer (High Salt) und TE-Puffer jeweils zwei Mal gewaschen. Die Beads wurden dann für 10 Minuten in TE-Puffer bei 96°C erhitzt und weiter mit RNase A (0.1µg/µl) für 45 Minuten bei 39°C, sowie mit Proteinase K (200ng/µl) für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Abschließend wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 96°C erhitzt. Für die finale Aufreinigung der Proben wurde das *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* verwendet.

Die Input-Probe und die aufgereinigten Proben wurden anschließend mittels quantitativer *Real-Time*-PCR auf die zu untersuchenden DNA-Fragmente überprüft. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet. Hierbei handelt es sich um bereits beschriebene Primerpaare aus der *MYC*-Promotorregion bzw. einer Region auf dem Chromosom 7, die als Negativkontrolle dient und nicht mit einer IRF4-Bindung assoziiert ist.^{136,143} Die Daten der quantitativen *Real-Time*-PCR

wurden abschließend mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode analysiert und auf die Werte der Input-Kontrolle normalisiert.

Tabelle 5: Chromatin-Immunpräzipitation *Real-Time*-PCR Primer

Primer-Name	Primer Sequenz
<i>Myc</i> Promotor - 0.4 kb - F	GGAGGGCAGCTGTTCCGCCTGCGATGA
<i>Myc</i> Promotor - 0.4 kb - R	AAACCGCATCCTTGTCCTGTGAGTATAAA
<i>Myc</i> Promotor + 0.3 kb - F	GCCTCTGGCCCAGCCCTCCCGCTGAT
<i>Myc</i> Promotor + 0.3 kb - R	GCAAAGTGCCCGCCCGCTGCTATGG
Negativkontrolle - F	AATATGTACATCAGGCAATCGGCTCTTC
Negativkontrolle - R	CAACTGGAATCAGATCCACTTCATGGAAA

4.14 Proteinnachweis mittels Immuno-Blot

4.14.1 Proteinextraktion

Bevor die Proteine der verschiedenen humanen Zelllinien gewonnen werden konnten, wurden die zentrifugierten Zellpellets einmal mit PBS gewaschen. Für die Lyse der Zellen wurden 30µl - 50µl des Lysispuffers *PhoshoSafe™ Extraction Reagent* verwendet. Nach dreißigminütiger Inkubation der Proben auf Eis, gelegentlichem resuspendieren und abschließender Zentrifugation für 45 Minuten bei 4°C, konnte das Proteinlysate gewonnen werden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

4.14.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 50µg Protein der zu untersuchenden Probe mit Laemmli-Ladepuffer versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12µl eingestellt. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 96°C erhitzt. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden ausschließlich 12%ige SDS-PAGE-Gele verwendet, die bei einer Spannung von

100V und einer maximalen Stromstärke von 20mA pro Gel für 90 Minuten im SDS-Lauf-Puffer liefen. Um bei der Detektion die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde der Größenstandard *PageRuler Prestained Protein Ladder* verwendet.

Die SDS-PAGE-Gele wurden nach folgender Rezeptur angefertigt:

<u>12% SDS-PAGE-Gel</u>		<u>5% Sammel-Gel</u>	
2,64 ml	H ₂ O	1,46 ml	H ₂ O
1,8 ml	Rotiphoese Gel 40	0,25 ml	Rotiphoese Gel 40
1,5 ml	Trenngel-Puffer	0,27 ml	Sammelgel-Puffer
60 µl	10% APS	20 µl	10% APS
2 µl	TEMED	2 µl	TEMED

4.14.3 Immuno-Blot

Der Proteinauftrennung im SDS-PAGE-Gel folgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. Hierfür wurde, wie auch in 4.14.2, das Blot-System *Mini-PROTEAN Tetra Cell* verwendet. Nach Aktivierung der PVDF-Membran mit 99%-igem Methanol wurde der Sandwich-Blot gemäß Protokoll aufgebaut. Der Proteintransfer erfolgte in Blotting-Puffer bei einer konstanten Spannung von 100V und einer maximalen Stromstärke von 100mA pro Gel für 90 Minuten. Abschließend wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten mit 5%-igen Milchpulver in PBS-T inkubiert, bevor der primäre Antikörper zur Detektion hinzugegeben wurde.

4.14.4 Proteindetektion

Für die Proteindetektion auf der PVDF-Membran wurde der primäre Antikörper gegen das zu untersuchende Protein in einem Verhältnis von 1:1000 mit 5%-igem Milchpulver in PBS-T verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde der Blot drei Mal mit PBS-T für jeweils fünf Minuten gewaschen, um im Anschluss daran mit einem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert

zu werden. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T konnte das Signal des Sekundärantikörpers detektiert werden. Hierfür wurden jeweils 400µl der *Lumi-Light Western Blotting Substrate* Reagenzien auf der Membran verteilt, die Messung erfolgte am *Image-Quant LAS 4000*.

4.15 Quantitative RT-PCR

Für die Untersuchung der mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR wurde auf das etablierte *TaqMan® Real-Time PCR* System von Life Technologies zurückgegriffen. Die hierfür erforderliche RNA-Extraktion erfolgte wie in 4.9.2 beschrieben. Für die anschließende Amplifikation der RNA in cDNA wurde das *GeneAmp Gold RNA PCR Core* Kit verwendet, wobei von jeder untersuchten Probe 1µg RNA eingesetzt wurde. Für die finale Messung am *StepOnePlus RT-PCR System* wurden die cDNA-Proben 1:3 verdünnt und hiervon 3µl mit 5µl *TaqMan Gene Expression Master Mix*, 1,5µl H₂O und 0,5µl der zu untersuchenden Taqman-Sonde vermengt und in die *MicroAmp® Fast Optical 96-Well* Platten gegeben. Zusätzlich zu der zu untersuchenden mRNA wurde für die spätere Normalisierung jede Probe auf den Gehalt der *GAPDH* mRNA überprüft.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, wobei zusätzlich jeder untersuchte Messwert auf den Wert der *GAPDH*-mRNA-Expression normalisiert wurde.

4.16 Viabilitätsmessung

Für die Messung der Zellviabilität nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren wurde das *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* verwendet. Die Durchführung folgte dem Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden 100µl Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 5×10^4 Zellen/ml in eine Rundboden-

96-Well-Platte pipettiert. Mittels Doppelbestimmung wurde anschließend der Effekt verschiedener Inhibitorkonzentrationen auf die Viabilität der Zelllinien untersucht, wobei alle Werte auf eine Kontrollmessung, ohne Inhibitorzugabe, normalisiert wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für 72h bzw. 96h. Die abschließende Messung der metabolisch aktiven Zellen mittels ATP-Gehaltsbestimmung erfolgte am *VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader* über die Bestimmung der relativen Lumineszenz.

4.17 Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalyse der ALK-positiven und ALK-negativen ALCL-Zelllinien DEL, K299 und FE-PD wurden die Zellen wie in 4.10 beschrieben, mit dem pRSMX-Vektor der shRNA #1 gegen die *IRF4*-mRNA infiziert, anschließend mit Puromycin selektioniert und expandiert. Für den Start der shRNA-Induktion wurde eine Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml gewählt. Jede infizierte Zelllinie wurde in zwei Untergruppen aufgeteilt, von denen bei einer die Expression der shRNA mit dem Antibiotikum Doxycyclin induziert wurde, wobei die andere Gruppe als nicht induzierte Kontrollgruppe diente, die keine Antibiotikum-induzierte shRNA-Expression erfuhr. Jeweils 24h, 48h, 72h und 96h nach Doxycyclinzugabe wurden von beiden Gruppen Zellen entnommen, diese einmal mit PBS gewaschen und das Zellpellet bei -80°C gelagert. Sobald alle Proben zur Verfügung standen, wurde die RNA, wie in 4.9.2 beschrieben, extrahiert und im Sinne einer Qualitätskontrolle die veränderte *IRF4* Expression bei den Proben, wie in 4.15 beschrieben, untersucht.

Der erfolgreichen Qualitätskontrolle folgte, in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Janz und Prof. Dr. Bernd Dörken am Max-Delbrück-Centrum, Berlin die Amplifikation der zu untersuchenden RNA mit Hilfe des *TotalPrep*

RNA Amplification Kits,. Anschließend wurde die amplifizierte RNA mit dem *HumanHT-12 v4 BeadChip* hybridisiert und die Signale detektiert.

Die bioinformatische Analyse der ermittelten Daten führten Dr. Michael Grau und Prof. Dr. Peter Lenz durch. Hierfür wurden die Daten jeder einzelnen Genexpressionsanalyse der Zelllinien DEL, K299 und FE-PD zusammengefasst und normalisiert.¹³⁸ Die Bestimmung der unterschiedlich exprimierten Gene erfolgte über die Berechnung eines *P*-Wertes für jedes Einzelgen mit Hilfe eines einfach gepaarten *t*-Tests. Zusätzlich wurde eine *False-Discovery-Rate* (FDR) für jeden signifikanten Wert ermittelt, deren Bestimmung über die so genannte *Benjamini-Hochberg*-Prozedur erfolgte.²⁰⁹ Für ein besseres Verständnis der Änderungen bei der Genexpression führten wir eine so genannte *Gene-Set-Enrichment*-Analyse durch.¹⁴⁰ Hierfür verglichen wir die Daten der Genexpressionsanalyse mit frei zugänglichen Signatur-Datenbanken. Die hier generierten Genexpressionsdaten wurden in der Datenbank *Gene Expression Omnibus* (GEO) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) hinterlegt und sind über die Akzessionsnummer GSE59747 abrufbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Anaplastisch-großzellige Lymphome (ALCL) repräsentieren eine Untergruppe der peripheren T-Zell-Lymphome und können über das Vorhandensein einer Translokation, die das *ALK*-Gen betrifft, in ALK-positive und ALK-negative ALCL unterteilt werden.

Präliminäre Daten implizieren eine starke Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 bei ALCL-Patientenproben, unabhängig des ALCL-Subtyps. Allerdings war die Rolle von IRF4 bei der Pathogenese des ALCL bislang wenig verstanden. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass eine shRNA-vermittelte Herunterregulation von *IRF4* Zytotoxizität im ALCL-Zelllinienmodell induziert und *in vivo* das Tumorwachstum signifikant verlangsamt. Genexpressionsanalysen zeigten die globale Rolle von IRF4 im Genexpressionsnetzwerk des ALCL über die Deregulation essentieller zellulärer Prozesse, wie der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur, sowie bekannter onkogener Signalwege wie Notch oder MYC. Wir konnten zeigen, dass IRF4 direkt an der Expression des bekannten onkogenen Transkriptionsfaktors *MYC* beteiligt ist und bestätigten zusätzlich die Abhängigkeit der ALCL-Zelllinien von dessen Expression. Die pharmakologische Inhibierung von MYC führte zum Rückgang der Zellviabilität aller ALCL-Zelllinien. Zusammenfassend zeigen diese Resultate, dass die Expression von IRF4 essentiell für die Proliferation von ALCL-Zelllinien ist und dass die von IRF4 regulierte Expression von MYC ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die zukünftige Behandlung sowohl ALK-positiver als auch ALK-negativer ALCL-Patienten darstellt.

Stichwörter:

ALCL, anaplastisch-großzelligen Lymphoms, IRF4, Transkriptionsfaktor

6 SUMMARY

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is a distinct entity of peripheral T-cell lymphomas. ALCLs can be divided into two subtypes with respect to the presence of translocations involving the *ALK* gene (ALK-positive and ALK-negative). It has been shown that the interferon regulatory factor 4 (IRF4) is highly expressed in both ALCL subtypes but its role in the pathogenesis of these lymphomas remained unclear.

Our study reveals an addiction to the expression of IRF4 in cell lines of both ALCL subtypes. Furthermore, we were able to transfer this into an ALCL xenograft mouse model showing the significant impact of IRF4 deregulation on ALCL tumor growth *in vivo*. Gene expression profiling after *IRF4* knockdown highlighted the function of IRF4 in anaplastic large cell lymphoma by significant downregulation of genes involved in essential cellular processes like cell cycle control and DNA repair as well as known targets of the oncogenic transcription factor MYC.

We were able to identify MYC as a direct target of IRF4 in both ALCL subtypes and further studies revealed an addiction of ALCLs to MYC expression as well. Pharmacological inhibition of MYC was toxic to all tested ALCL cell lines, indicating that IRF4 and MYC signaling may represent promising targets for future therapies of patients diagnosed with anaplastic large cell lymphoma.

Keywords:

ALCL, anaplastic large cell lymphoma, IRF4, transcription factor

7 REFERENZEN

1. Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific American*. 1996;275(3):62-70. Prepublished on 1996/09/01 as DOI.
2. Kenneth M. Murphy, Paul Travers, Mark Walport. Janeway Immunologie. Vol. 7.: Springer Spektrum; 2014.
3. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*. 1832;17:68-114.
4. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.
5. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene Expression Profiling of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals a Homogeneous Phenotype Related to Memory B Cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-1638.
6. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-1947.
7. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):920-932.
8. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4124-4130. Prepublished on 2008/07/16 as DOI 10.1200/JCO.2008.16.4558.
9. Skarbnik AP, Burki M, Pro B. Peripheral T-cell lymphomas: a review of current approaches and hopes for the future. *Frontiers in oncology*. 2013;3:138. Prepublished on 2013/06/12 as DOI 10.3389/fonc.2013.00138.
10. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4). Lyon, France: IRAC PRESS; 2008.
11. Savage KJ. Peripheral T-cell lymphomas. *Blood reviews*. 2007;21(4):201-216. Prepublished on 2007/05/22 as DOI 10.1016/j.blre.2007.03.001.
12. Ascani S, Zinzani PL, Gherlinzoni F, et al. Peripheral T-cell lymphomas. Clinico-pathologic study of 168 cases diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1997;8(6):583-592. Prepublished on 1997/06/01 as DOI.
13. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 1998;9(7):717-720. Prepublished on 1998/09/18 as DOI.
14. Nakamura S, Koshikawa T, Koike K, et al. Phenotypic analysis of peripheral T cell lymphoma among the Japanese. *Acta pathologica japonica*. 1993;43(7-8):396-412. Prepublished on 1993/07/01 as DOI.
15. Rudiger T, Weisenburger DD, Anderson JR, et al. Peripheral T-cell lymphoma (excluding anaplastic large-cell lymphoma): results from the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2002;13(1):140-149. Prepublished on 2002/02/28 as DOI.
16. Melnyk A, Rodriguez A, Pugh WC, Cabanillas F. Evaluation of the Revised European-American Lymphoma classification confirms the clinical relevance of immunophenotype in 560 cases of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89(12):4514-4520. Prepublished on 1997/06/15 as DOI.
17. Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, et al. Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1998;92(1):76-82. Prepublished on 1998/06/25 as DOI.

18. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-4963. Prepublished on 2007/02/08 as DOI 10.1182/blood-2006-10-055145.
19. Weiss LM, Jaffe ES, Liu XF, Chen YY, Shibata D, Medeiros LJ. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood*. 1992;79(7):1789-1795. Prepublished on 1992/04/01 as DOI.
20. Savage KJ, Chhanabhai M, Gascoyne RD, Connors JM. Characterization of peripheral T-cell lymphomas in a single North American institution by the WHO classification. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2004;15(10):1467-1475. Prepublished on 2004/09/16 as DOI 10.1093/annonc/mdh392.
21. Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*. 1982;299(5878):65-67.
22. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66(4):848-858.
23. Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *Journal of immunology*. 1998;160(5):2180-2187. Prepublished on 1998/03/14 as DOI.
24. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-1392. Prepublished on 1994/09/01 as DOI.
25. Foss HD, Reusch R, Demel G, et al. Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*. 1999;94(9):3108-3113. Prepublished on 1999/11/11 as DOI.
26. Beljaards RC, Meijer CJ, Scheffer E, et al. Prognostic significance of CD30 (Ki-1/Ber-H2) expression in primary cutaneous large-cell lymphomas of T-cell origin. A clinicopathologic and immunohistochemical study in 20 patients. *The American journal of pathology*. 1989;135(6):1169-1178. Prepublished on 1989/12/01 as DOI.
27. Kaudewitz P, Stein H, Dallenbach F, et al. Primary and secondary cutaneous Ki-1+ (CD30+) anaplastic large cell lymphomas. Morphologic, immunohistologic, and clinical-characteristics. *The American journal of pathology*. 1989;135(2):359-367. Prepublished on 1989/08/01 as DOI.
28. Rimokh R, Magaud JP, Berger F, et al. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *British journal of haematology*. 1989;71(1):31-36. Prepublished on 1989/01/01 as DOI.
29. Krenacs L, Wellmann A, Sorbara L, et al. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. *Blood*. 1997;89(3):980-989. Prepublished on 1997/02/01 as DOI.
30. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, et al. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood*. 2004;104(10):3358-3360. Prepublished on 2004/08/07 as DOI 10.1182/blood-2004-03-1037.
31. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood*. 1996;88(10):4005-4011. Prepublished on 1996/11/15 as DOI.
32. Herbst H, Tippelmann G, Anagnostopoulos I, et al. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma: dissociation between phenotype and genotype. *Leukemia research*. 1989;13(2):103-116. Prepublished on 1989/01/01 as DOI.

33. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281-1284.
34. Ladanyi M. The NPM/ALK gene fusion in the pathogenesis of anaplastic large cell lymphoma. *Cancer surveys*. 1997;30:59-75. Prepublished on 1997/01/01 as DOI.
35. Fujimoto J, Shiota M, Iwahara T, et al. Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):4181-4186. Prepublished on 1996/04/30 as DOI.
36. Liu QR, Chan PK. Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino- and the carboxyl-terminal domains of the protein. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1991;200(3):715-721. Prepublished on 1991/09/15 as DOI.
37. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. 1989;56(3):379-390. Prepublished on 1989/02/10 as DOI.
38. Mason DY, Pulford KA, Bischof D, et al. Nucleolar localization of the nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase is not required for malignant transformation. *Cancer research*. 1998;58(5):1057-1062. Prepublished on 1998/03/21 as DOI.
39. Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(4):2312-2325. Prepublished on 1997/04/01 as DOI.
40. Delsol G, Lamant L, Mariame B, et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood*. 1997;89(5):1483-1490. Prepublished on 1997/03/01 as DOI.
41. Stein H, Foss HD, Durkop H, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000;96(12):3681-3695. Prepublished on 2000/11/23 as DOI.
42. Pulford K, Lamant L, Morris SW, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*. 1997;89(4):1394-1404. Prepublished on 1997/02/15 as DOI.
43. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Berton F. Advances in understanding the pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphomas. *British journal of haematology*. 2015;168(6):771-783. Prepublished on 2015/01/07 as DOI 10.1111/bjh.13265.
44. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, et al. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood*. 1997;90(8):2901-2910. Prepublished on 1997/10/24 as DOI.
45. Falini B, Pulford K, Pucciarini A, et al. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood*. 1999;94(10):3509-3515. Prepublished on 1999/11/24 as DOI.
46. Bohling SD, Jenson SD, Crockett DK, Schumacher JA, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Analysis of gene expression profile of TPM3-ALK positive anaplastic large cell lymphoma reveals overlapping and unique patterns with that of NPM-ALK positive anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Res*. 2008;32(3):383-393. Prepublished on 2007/08/28 as DOI 10.1016/j.leukres.2007.07.012.
47. Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2004;199(3):330-358. Prepublished on 2004/04/20 as DOI 10.1002/jcp.10472.
48. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(1):11-23. Prepublished on 2007/12/22 as DOI 10.1038/nrc2291.
49. Voena C, Conte C, Ambrogio C, et al. The tyrosine phosphatase Shp2 interacts with NPM-ALK and regulates anaplastic lymphoma cell growth and migration. *Cancer Res*. 2007;67(9):4278-4286. Prepublished on 2007/05/08 as DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-4350.

50. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, et al. Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer research*. 2006;66(13):6589-6597. Prepublished on 2006/07/05 as DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-3018.
51. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nature medicine*. 2005;11(6):623-629. Prepublished on 2005/05/17 as DOI 10.1038/nm1249.
52. Zamo A, Chiarle R, Piva R, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. 2002;21(7):1038-1047.
53. Marzec M, Kasprzycka M, Ptasznik A, et al. Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005;85(12):1544-1554. Prepublished on 2005/09/20 as DOI 10.1038/labinvest.3700348.
54. Amin HM, Medeiros LJ, Ma Y, et al. Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2003;22(35):5399-5407. Prepublished on 2003/08/23 as DOI 10.1038/sj.onc.1206849.
55. Coluccia AM, Perego S, Cleris L, et al. Bcl-XL down-regulation suppresses the tumorigenic potential of NPM/ALK in vitro and in vivo. *Blood*. 2004;103(7):2787-2794. Prepublished on 2003/12/06 as DOI 10.1182/blood-2003-09-3144.
56. Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, et al. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3171-3182. Prepublished on 2006/11/18 as DOI 10.1172/JCI29401.
57. Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood*. 2000;96(13):4319-4327. Prepublished on 2000/12/09 as DOI.
58. Rassidakis GZ, Feretzaki M, Atwell C, et al. Inhibition of Akt increases p27Kip1 levels and induces cell cycle arrest in anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2005;105(2):827-829. Prepublished on 2004/09/18 as DOI 10.1182/blood-2004-06-2125.
59. Slupianek A, Skorski T. NPM/ALK downregulates p27Kip1 in a PI-3K-dependent manner. *Experimental hematology*. 2004;32(12):1265-1271. Prepublished on 2004/12/14 as DOI 10.1016/j.exphem.2004.11.002.
60. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, Raghunath PN, Wlodarski P, Wasik MA. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene*. 2007;26(6):813-821. Prepublished on 2006/08/16 as DOI 10.1038/sj.onc.1209843.
61. Staber PB, Vesely P, Haq N, et al. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood*. 2007;110(9):3374-3383. Prepublished on 2007/08/11 as DOI 10.1182/blood-2007-02-071258.
62. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the rapamycin-sensitive mTOR signaling pathway. *Oncogene*. 2007;26(38):5606-5614. Prepublished on 2007/03/14 as DOI 10.1038/sj.onc.1210346.
63. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(32):5426-5434. Prepublished on 2004/06/09 as DOI 10.1038/sj.onc.1207703.
64. Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer research*. 2001;61(5):2194-2199. Prepublished on 2001/03/31 as DOI.

65. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2011;364(8):775-776. Prepublished on 2011/02/25 as DOI 10.1056/NEJMc1013224.
66. Christensen JG. Proof of principle for crizotinib in anaplastic lymphoma kinase-positive malignancies was achieved in ALK-positive nonclinical models. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(11):2024. Prepublished on 2011/11/11 as DOI 10.1158/1535-7163.MCT-11-0721.
67. Hamedani FS, Cinar M, Mo Z, Cervania MA, Amin HM, Alkan S. Crizotinib (PF-2341066) induces apoptosis due to downregulation of pSTAT3 and BCL-2 family proteins in NPM-ALK(+) anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia research*. 2014;38(4):503-508. Prepublished on 2014/02/04 as DOI 10.1016/j.leukres.2013.12.027.
68. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93(8):2697-2706. Prepublished on 1999/04/09 as DOI.
69. Gascoyne RD, Aoun P, Wu D, et al. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 1999;93(11):3913-3921.
70. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91(6):2076-2084. Prepublished on 1998/04/16 as DOI.
71. Querfeld C, Khan I, Mahon B, Nelson BP, Rosen ST, Evens AM. Primary cutaneous and systemic anaplastic large cell lymphoma: clinicopathologic aspects and therapeutic options. *Oncology*. 2010;24(7):574-587. Prepublished on 2010/07/31 as DOI.
72. Boddicker RL, Kip NS, Xing X, et al. The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF-kappaB positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2015. Prepublished on 2015/04/03 as DOI 10.1182/blood-2014-05-578575.
73. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, et al. Convergent Mutations and Kinase Fusions Lead to Oncogenic STAT3 Activation in Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Cancer cell*. 2015;27(4):516-532. Prepublished on 2015/04/16 as DOI 10.1016/j.ccell.2015.03.006.
74. Thompson MA, Stumph J, Henrickson SE, et al. Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2005;36(5):494-504. Prepublished on 2005/06/11 as DOI 10.1016/j.humpath.2005.03.004.
75. Lamant L, de Reynies A, Duplantier MM, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood*. 2007;109(5):2156-2164. Prepublished on 2006/11/02 as DOI 10.1182/blood-2006-06-028969.
76. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E, et al. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1583-1590. Prepublished on 2010/02/18 as DOI 10.1200/JCO.2008.20.9759.
77. Fujita T, Sakakibara J, Sudo Y, Miyamoto M, Kimura Y, Taniguchi T. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *The EMBO journal*. 1988;7(11):3397-3405. Prepublished on 1988/11/01 as DOI.
78. Fujita T, Kimura Y, Miyamoto M, Barsoumian EL, Taniguchi T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature*. 1989;337(6204):270-272. Prepublished on 1989/01/19 as DOI 10.1038/337270a0.
79. Miyamoto M, Fujita T, Kimura Y, et al. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*. 1988;54(6):903-913. Prepublished on 1988/09/09 as DOI.
80. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, et al. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*. 1989;58(4):729-739. Prepublished on 1989/08/25 as DOI.

81. Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(4):293-312. Prepublished on 1998/06/10 as DOI.
82. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:227-264. Prepublished on 1998/10/06 as DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.
83. Tanaka N, Ishihara M, Lamphier MS, et al. Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1996;382(6594):816-818. Prepublished on 1996/08/29 as DOI 10.1038/382816a0.
84. Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, et al. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*. 1999;237(1):1-14. Prepublished on 1999/10/19 as DOI.
85. Fujii Y, Shimizu T, Kusumoto M, Kyogoku Y, Taniguchi T, Hakoshima T. Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO journal*. 1999;18(18):5028-5041. Prepublished on 1999/09/16 as DOI 10.1093/emboj/18.18.5028.
86. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology*. 2001;19:623-655. Prepublished on 2001/03/13 as DOI 10.1146/annurev.immunol.19.1.623.
87. Meraro D, Hashmueli S, Koren B, et al. Protein-protein and DNA-protein interactions affect the activity of lymphoid-specific IFN regulatory factors. *Journal of immunology*. 1999;163(12):6468-6478. Prepublished on 1999/12/10 as DOI.
88. Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(2):125-135.
89. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216. Prepublished on 2002/02/28 as DOI 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
90. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Prepublished on 2006/02/25 as DOI 10.1016/j.cell.2006.02.015.
91. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology*. 2006;7(12):1250-1257. Prepublished on 2006/11/18 as DOI 10.1038/ni1412.
92. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2001;1(2):135-145. Prepublished on 2002/03/22 as DOI 10.1038/35100529.
93. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14. Prepublished on 2004/12/09 as DOI 10.1093/intimm/dxh186.
94. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell death and differentiation*. 2006;13(5):816-825. Prepublished on 2006/01/18 as DOI 10.1038/sj.cdd.4401850.
95. Burysek L, Yeow WS, Lubyova B, et al. Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300. *Journal of virology*. 1999;73(9):7334-7342. Prepublished on 1999/08/10 as DOI.
96. Burysek L, Yeow WS, Pitha PM. Unique properties of a second human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor (vIRF-2). *Journal of human virology*. 1999;2(1):19-32. Prepublished on 1999/04/14 as DOI.
97. Lin R, Genin P, Mamane Y, et al. HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators. *Oncogene*. 2001;20(7):800-811. Prepublished on 2001/04/21 as DOI 10.1038/sj.onc.1204163.
98. Eisenbeis CF, Singh H, Storb U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev*. 1995;9(11):1377-1387.
99. Williams JW, Tjota MY, Clay BS, et al. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nature communications*. 2013;4:2990. Prepublished on 2013/12/21 as DOI 10.1038/ncomms3990.

100. Marecki S, Atchison ML, Fenton MJ. Differential expression and distinct functions of IFN regulatory factor 4 and IFN consensus sequence binding protein in macrophages. *Journal of immunology*. 1999;163(5):2713-2722. Prepublished on 1999/08/24 as DOI.
101. Lu R, Medina KL, Lancki DW, Singh H. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev*. 2003;17(14):1703-1708.
102. Shukla V, Lu R. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B Lymphocytes. *Frontiers in biology*. 2014;9(4):269-282. Prepublished on 2014/12/17 as DOI 10.1007/s11515-014-1318-y.
103. Cattorette G, Shaknovich R, Smith PM, Jack HM, Murty VV, Alobeid B. Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *Journal of immunology*. 2006;177(10):6930-6939. Prepublished on 2006/11/04 as DOI.
104. Grumont RJ, Gerondakis S. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. *J Exp Med*. 2000;191(8):1281-1292.
105. Saito M, Gao J, Basso K, et al. A Signaling Pathway Mediating Downregulation of BCL6 in Germinal Center B Cells Is Blocked by BCL6 Gene Alterations in B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2007;12(3):280-292.
106. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000;13(2):199-212.
107. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 2003;19(4):607-620.
108. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-236.
109. Man K, Miasari M, Shi W, et al. The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nature immunology*. 2013;14(11):1155-1165. Prepublished on 2013/09/24 as DOI 10.1038/ni.2710.
110. Raczkowski F, Ritter J, Heesch K, et al. The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(37):15019-15024. Prepublished on 2013/08/28 as DOI 10.1073/pnas.1309378110.
111. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science*. 1997;275(5299):540-543. Prepublished on 1997/01/24 as DOI.
112. Hu CM, Jang SY, Fanzo JC, Pernis AB. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49238-49246. Prepublished on 2002/10/11 as DOI 10.1074/jbc.M205895200.
113. Lohoff M, Mittrucker HW, Prechtel S, et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11808-11812. Prepublished on 2002/08/22 as DOI 10.1073/pnas.182425099.
114. Brass AL, Kehrli E, Eisenbeis CF, Storb U, Singh H. Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev*. 1996;10(18):2335-2347.
115. Tussiwand R, Lee WL, Murphy TL, et al. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*. 2012;490(7421):502-507. Prepublished on 2012/09/21 as DOI 10.1038/nature11531.
116. Li P, Spolski R, Liao W, et al. BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature*. 2012;490(7421):543-546. Prepublished on 2012/09/21 as DOI 10.1038/nature11530.
117. Glasmacher E, Agrawal S, Chang AB, et al. A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science*. 2012;338(6109):975-980. Prepublished on 2012/09/18 as DOI 10.1126/science.1228309.

118. Ciofani M, Madar A, Galan C, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. 2012;151(2):289-303. Prepublished on 2012/10/02 as DOI 10.1016/j.cell.2012.09.016.
119. Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, et al. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(5):933-942. Prepublished on 2010/04/28 as DOI 10.1084/jem.20091548.
120. Jabeen R, Goswami R, Awe O, et al. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(11):4641-4653. Prepublished on 2013/11/13 as DOI 10.1172/JCI69489.
121. Brustle A, Heink S, Huber M, et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nature immunology*. 2007;8(9):958-966. Prepublished on 2007/08/07 as DOI 10.1038/ni1500.
122. Schraml BU, Hildner K, Ise W, et al. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature*. 2009;460(7253):405-409. Prepublished on 2009/07/07 as DOI 10.1038/nature08114.
123. Yao S, Buzo BF, Pham D, et al. Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity*. 2013;39(5):833-845. Prepublished on 2013/11/12 as DOI 10.1016/j.immuni.2013.10.007.
124. Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, et al. The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nature immunology*. 2014;15(4):373-383. Prepublished on 2014/03/04 as DOI 10.1038/ni.2834.
125. Iida S, Rao PH, Butler M, et al. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet*. 1997;17(2):226-230.
126. Yoshida S, Nakazawa N, Iida S, et al. Detection of MUM1/IRF4-IgH fusion in multiple myeloma. *Leukemia*. 1999;13(11):1812-1816.
127. Shaffer AL, Emre NC, Lamy L, et al. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*. 2008;454(7201):226-231.
128. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(9):2954-2961. Prepublished on 2009/04/23 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-1845.
129. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000;95(6):2084-2092. Prepublished on 2000/03/09 as DOI.
130. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2000;14(3):449-456.
131. Feldman AL, Law M, Remstein ED, et al. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2009;23(3):574-580. Prepublished on 2008/11/07 as DOI 10.1038/leu.2008.320.
132. Klein U, Casola S, Cattoretti G, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2006;7(7):773-782.
133. Verdelli D, Nobili L, Todoerti K, et al. Molecular targeting of the PKC-beta inhibitor enzastaurin (LY317615) in multiple myeloma involves a coordinated downregulation of MYC and IRF4 expression. *Hematological oncology*. 2009;27(1):23-30. Prepublished on 2008/09/02 as DOI 10.1002/hon.875.
134. Xu D, Zhao L, Del Valle L, Miklossy J, Zhang L. Interferon regulatory factor 4 is involved in Epstein-Barr virus-mediated transformation of human B lymphocytes. *Journal of virology*. 2008;82(13):6251-6258. Prepublished on 2008/04/18 as DOI 10.1128/JVI.00163-08.
135. Aldinucci D, Celegato M, Borghese C, Colombatti A, Carbone A. IRF4 silencing inhibits Hodgkin lymphoma cell proliferation, survival and CCL5 secretion. *British journal of haematology*. 2011;152(2):182-190. Prepublished on 2010/12/01 as DOI 10.1111/j.1365-2141.2010.08497.x.

136. Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2012;21(6):723-737. Prepublished on 2012/06/16 as DOI 10.1016/j.ccr.2012.05.024.
137. Sharma S, Mamane Y, Grandvaux N, et al. Activation and regulation of interferon regulatory factor 4 in HTLV type 1-infected T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(16):1613-1622.
138. Weilemann A, Grau M, Erdmann T, et al. Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015;125(1):124-132. Prepublished on 2014/11/02 as DOI 10.1182/blood-2014-08-594507.
139. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*. 2006;441(7089):106-110.
140. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(43):15545-15550. Prepublished on 2005/10/04 as DOI 10.1073/pnas.0506580102.
141. Shaffer AL, Wright G, Yang L, et al. A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol Rev*. 2006;210:67-85. Prepublished on 2006/04/21 as DOI 10.1111/j.0105-2896.2006.00373.x.
142. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. 2011;27(12):1739-1740. Prepublished on 2011/05/07 as DOI 10.1093/bioinformatics/btr260.
143. Rui L, Emre NC, Kruhlak MJ, et al. Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell*. 2010;18(6):590-605. Prepublished on 2010/12/16 as DOI S1535-6108(10)00481-2 [pii]10.1016/j.ccr.2010.11.013.
144. Marzec M, Halasa K, Liu X, et al. Malignant transformation of CD4+ T lymphocytes mediated by oncogenic kinase NPM/ALK recapitulates IL-2-induced cell signaling and gene expression reprogramming. *Journal of immunology*. 2013;191(12):6200-6207. Prepublished on 2013/11/13 as DOI 10.4049/jimmunol.1300744.
145. Jernberg-Wiklund H, Pettersson M, Larsson LG, Anton R, Nilsson K. Expression of myc-family genes in established human multiple myeloma cell lines: L-myc but not c-myc gene expression in the U-266 myeloma cell line. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1992;51(1):116-123. Prepublished on 1992/04/22 as DOI.
146. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. 10.1073/pnas.1305656110.
147. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-917. Prepublished on 2011/09/06 as DOI 10.1016/j.cell.2011.08.017.
148. Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(40):16669-16674. Prepublished on 2011/09/29 as DOI 10.1073/pnas.1108190108.
149. Drexler HG, MacLeod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of anaplastic large-cell lymphoma. *Leukemia*. 2004;18(10):1569-1571. Prepublished on 2004/09/10 as DOI 10.1038/sj.leu.2403465.
150. Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, et al. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol*. 2008;180(7):4805-4815.
151. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(6):400-414. Prepublished on 2009/05/15 as DOI 10.1038/nrc2657.

152. Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene*. 1998;16(2):217-225. Prepublished on 1998/02/17 as DOI 10.1038/sj.onc.1201529.
153. Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*. 1995;375(6527):159-161. Prepublished on 1995/05/11 as DOI 10.1038/375159a0.
154. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 2007;129(4):665-679. Prepublished on 2007/05/22 as DOI 10.1016/j.cell.2007.05.003.
155. Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(3):179-186. Prepublished on 2001/03/17 as DOI 10.1038/35043058.
156. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(3):155-168. Prepublished on 2003/03/04 as DOI 10.1038/nrc1011.
157. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *American journal of human genetics*. 1998;62(2):334-345. Prepublished on 1998/04/16 as DOI 10.1086/301706.
158. Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, et al. ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*. 2012;97(1):47-55. Prepublished on 2011/10/14 as DOI 10.3324/haematol.2011.049270.
159. Pusapati RV, Rounbehler RJ, Hong S, et al. ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(5):1446-1451. Prepublished on 2006/01/25 as DOI 10.1073/pnas.0507367103.
160. Collier HA, Grandori C, Tamayo P, et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(7):3260-3265. Prepublished on 2000/03/29 as DOI.
161. Bild AH, Yao G, Chang JT, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature*. 2006;439(7074):353-357. Prepublished on 2005/11/08 as DOI 10.1038/nature04296.
162. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2431-2442.
163. Nie Z, Hu G, Wei G, et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012;151(1):68-79. Prepublished on 2012/10/02 as DOI 10.1016/j.cell.2012.08.033.
164. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905. Prepublished on 2010/02/19 as DOI [nature08822 \[pii\]10.1038/nature08822](https://doi.org/10.1038/nature08822).
165. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(24):7824-7827. Prepublished on 1982/12/01 as DOI.
166. Inghirami G, Macri L, Cesarman E, Chadburn A, Zhong J, Knowles DM. Molecular characterization of CD30+ anaplastic large-cell lymphoma: high frequency of c-myc proto-oncogene activation. *Blood*. 1994;83(12):3581-3590. Prepublished on 1994/06/15 as DOI.
167. Liang X, Branchford B, Greffe B, et al. Dual ALK and MYC rearrangements leading to an aggressive variant of anaplastic large cell lymphoma. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2013;35(5):e209-213. Prepublished on 2013/04/27 as DOI 10.1097/MPH.0b013e3182815046.

168. Moritake H, Shimonodan H, Marutsuka K, Kamimura S, Kojima H, Nunoi H. C-MYC rearrangement may induce an aggressive phenotype in anaplastic lymphoma kinase positive anaplastic large cell lymphoma: Identification of a novel fusion gene ALO17/C-MYC. *American journal of hematology*. 2011;86(1):75-78. Prepublished on 2010/11/17 as DOI 10.1002/ajh.21887.
169. Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*. 2014;123(16):2451-2459. Prepublished on 2014/03/13 as DOI 10.1182/blood-2013-08-355818.
170. Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer cell*. 2014;25(3):318-334. Prepublished on 2014/03/22 as DOI 10.1016/j.ccr.2014.02.018.
171. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-271. Prepublished on 2004/10/09 as DOI 10.1126/science.1102160.
172. Love C, Sun Z, Jima D, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nature genetics*. 2012;44(12):1321-1325. Prepublished on 2012/11/13 as DOI 10.1038/ng.2468.
173. Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, et al. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer science*. 2009;100(5):920-926. Prepublished on 2009/05/16 as DOI.
174. Kamstrup MR, Biskup E, Gjerdrum LM, Ralfkiaer E, Niazi O, Gniadecki R. The importance of Notch signaling in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(3):639-644. Prepublished on 2013/05/24 as DOI 10.3109/10428194.2013.807510.
175. Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(48):18261-18266. Prepublished on 2006/11/23 as DOI 10.1073/pnas.0606108103.
176. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development*. 2006;20(15):2096-2109. Prepublished on 2006/07/19 as DOI 10.1101/gad.1450406.
177. Herranz D, Ambesi-Impiombato A, Palomero T, et al. A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine*. 2014;20(10):1130-1137. Prepublished on 2014/09/10 as DOI 10.1038/nm.3665.
178. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. 1999;399(6735):491-496. Prepublished on 1999/06/12 as DOI 10.1038/20974.
179. Zuber J, Shi J, Wang E, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2011;478(7370):524-528. Prepublished on 2011/08/05 as DOI 10.1038/nature10334.
180. Alderton GK. Targeting MYC? You BET. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(10):693. Prepublished on 2011/09/24 as DOI 10.1038/nrc3147.
181. Eyre TA, Khan D, Hall GW, Collins GP. Anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma: current and future perspectives in adult and paediatric disease. *European journal of haematology*. 2014;93(6):455-468. Prepublished on 2014/04/29 as DOI 10.1111/ejh.12360.
182. Sibon D, Fournier M, Briere J, et al. Long-term outcome of adults with systemic anaplastic large-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(32):3939-3946. Prepublished on 2012/10/10 as DOI 10.1200/JCO.2012.42.2345.
183. Coude MM, Braun T, Berrou J, et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget*. 2015;6(19):17698-17712. Prepublished on 2015/05/21 as DOI.

184. Boi M, Gaudio E, Bonetti P, et al. The BET Bromodomain Inhibitor OTX015 Affects Pathogenetic Pathways in Preclinical B-cell Tumor Models and Synergizes with Targeted Drugs. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1628-1638. Prepublished on 2015/01/28 as DOI 10.1158/1078-0432.CCR-14-1561.
185. Hoeller S, Zihler D, Zlobec I, et al. BOB.1, CD79a and cyclin E are the most appropriate markers to discriminate classical Hodgkin's lymphoma from primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Histopathology*. 2010;56(2):217-228. Prepublished on 2010/01/28 as DOI 10.1111/j.1365-2559.2009.03462.x.
186. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2013. Prepublished on 2013/12/18 as DOI 10.1038/modpathol.2013.214.
187. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282.
188. Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, et al. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood*. 2012;120(22):4400-4406. Prepublished on 2012/09/29 as DOI 10.1182/blood-2012-05-428466.
189. Fischer P, Nacheva E, Mason DY, et al. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood*. 1988;72(1):234-240. Prepublished on 1988/07/01 as DOI.
190. Kadin ME, Cavaille-Col MW, Sioutos N, Fletcher JA, Morton CC, Pastuzak W. Childhood Ki-1+ anaplastic large cell lymphoma: establishment and characterization of a new tumor cell line transplantable to SCID mice. *Blood*. 1990;76:354a.
191. Barbey S, Gogusev J, Mouly H, et al. DEL cell line: a "malignant histiocytosis" CD30+ t(5;6)(q35;p21) cell line. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1990;45(3):546-553. Prepublished on 1990/03/15 as DOI.
192. Epstein AL, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas. I. Establishment in continuous cell culture and heterotransplantation of diffuse histiocytic lymphomas. *Cancer*. 1974;34(6):1851-1872. Prepublished on 1974/12/01 as DOI.
193. del Mistro A, Leszl A, Bertorelle R, et al. A CD30-positive T cell line established from an aggressive anaplastic large cell lymphoma, originally diagnosed as Hodgkin's disease. *Leukemia*. 1994;8(7):1214-1219. Prepublished on 1994/07/01 as DOI.
194. Su IJ, Kadin ME. Expression of growth factor/receptor genes in postthymic T cell malignancies. *The American journal of pathology*. 1989;135(3):439-445. Prepublished on 1989/09/01 as DOI.
195. Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA, et al. Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 1980;55(3):409-417. Prepublished on 1980/03/01 as DOI.
196. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1977;19(5):621-626. Prepublished on 1977/05/15 as DOI.
197. Drexler HG, Gaedicke G, Minowada J. Isoenzyme studies in human leukemia-lymphoma cell lines--1. Carboxylic esterase. *Leukemia research*. 1985;9(2):209-229. Prepublished on 1985/01/01 as DOI.
198. Gazdar AF, Oie HK, Kirsch IR, Hollis GF. Establishment and characterization of a human plasma cell myeloma culture having a rearranged cellular myc proto-oncogene. *Blood*. 1986;67(6):1542-1549. Prepublished on 1986/06/01 as DOI.

199. Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Ponten J. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clinical and experimental immunology*. 1970;7(4):477-489. Prepublished on 1970/10/01 as DOI.
200. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296(5567):550-553.
201. Peredo C, O'Reilly L, Gray K, Roth MJ. Characterization of chimeras between the ecotropic Moloney murine leukemia virus and the amphotropic 4070A envelope proteins. *Journal of virology*. 1996;70(5):3142-3152. Prepublished on 1996/05/01 as DOI.
202. Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, et al. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic acids research*. 1995;23(4):628-633. Prepublished on 1995/02/25 as DOI.
203. O'Reilly L, Roth MJ. G541R within the 4070A TM protein regulates fusion in murine leukemia viruses. *J Virol*. 2003;77(22):12011-12021.
204. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol*. 1995;69(12):7430-7436.
205. Bupp K, Roth MJ. Altering retroviral tropism using a random-display envelope library. *Mol Ther*. 2002;5(3):329-335.
206. Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal*. 2004;86(2):1234-1242. Prepublished on 2004/01/30 as DOI 10.1016/S0006-3495(04)74197-1.
207. Wenzel SS, Grau M, Mavis C, et al. MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2013;27(6):1381-1390. Prepublished on 2012/12/22 as DOI 10.1038/leu.2012.367 leu2012367 [pii].
208. Nogai H, Wenzel SS, Hailfinger S, et al. IkappaB-zeta controls the constitutive NF-kappaB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*. 2013;122(13):2242-2250. Prepublished on 2013/07/23 as DOI 10.1182/blood-2013-06-508028 blood-2013-06-508028 [pii].
209. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*. 1995;57(1):289-300.

8 ANHANG

Tabelle 6: Signifikant deregulierte Gene nach *IRF4* Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Herunterreguliert	ABHD6	57406	abhydrolase domain containing 6
Herunterreguliert	ACSS1	84532	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
Herunterreguliert	ALB	213	albumin
Herunterreguliert	ARIH2	10425	ariadne homolog 2 (Drosophila)
Herunterreguliert	BAG2	9532	BCL2-associated athanogene 2
Herunterreguliert	BBS2	583	Bardet-Biedl syndrome 2
Herunterreguliert	C16orf59	80178	chromosome 16 open reading frame 59
Herunterreguliert	CAPN14	440854	calpain 14
Herunterreguliert	CCDC86	79080	coiled-coil domain containing 86
Herunterreguliert	CCR7	1236	chemokine (C-C motif) receptor 7
Herunterreguliert	CD59	966	CD59 molecule, complement regulatory protein
Herunterreguliert	CELF1	10658	CUGBP, Elav-like family member 1
Herunterreguliert	CHST4	10164	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4
Herunterreguliert	CIRH1A	84916	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)
Herunterreguliert	CRABP2	1382	cellular retinoic acid binding protein 2
Herunterreguliert	CTTN	2017	cortactin
Herunterreguliert	DACH1	1602	dachshund homolog 1 (Drosophila)
Herunterreguliert	DAG1	1605	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
Herunterreguliert	DBNDD1	79007	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1
Herunterreguliert	DDN	23109	dendrin
Herunterreguliert	DHRS11	79154	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11
Herunterreguliert	DMRT1	1761	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
Herunterreguliert	E2F6	1876	E2F transcription factor 6
Herunterreguliert	EEA1	8411	early endosome antigen 1
Herunterreguliert	EIF2C2	27161	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
Herunterreguliert	EIF2S2	8894	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa
Herunterreguliert	FAM161B	145483	family with sequence similarity 161, member B
Herunterreguliert	FAM86C2P	645332	family with sequence similarity 86, member A pseudogene
Herunterreguliert	FAM86JP	100125556	family with sequence similarity 86, member A pseudogene
Herunterreguliert	FBXO44	93611	F-box protein 44
Herunterreguliert	FJX1	24147	four jointed box 1 (Drosophila)
Herunterreguliert	GATC	283459	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C homolog (bacterial)
Herunterreguliert	GNL3	26354	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
Herunterreguliert	GNPDA1	10007	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
Herunterreguliert	HEATR1	55127	HEAT repeat containing 1
Herunterreguliert	HK2P1	642546	hexokinase 2 pseudogene 1
Herunterreguliert	HSPH1	10808	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
Herunterreguliert	IL2RA	3559	interleukin 2 receptor, alpha
Herunterreguliert	ING5	84289	inhibitor of growth family, member 5
Herunterreguliert	IRF4	3662	interferon regulatory factor 4
Herunterreguliert	ITK	3702	IL2-inducible T-cell kinase

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Herunterreguliert	LIG3	3980	ligase III, DNA, ATP-dependent
Herunterreguliert	LOC100128881	100128881	uncharacterized LOC100128881
Herunterreguliert	LOC442727	442727	prothymosin, alpha pseudogene
Herunterreguliert	LOC728026	728026	prothymosin alpha-like
Herunterreguliert	LYRM5	144363	LYR motif containing 5
Herunterreguliert	MAK	4117	male germ cell-associated kinase
Herunterreguliert	MFSD6L	162387	major facilitator superfamily domain containing 6-like
Herunterreguliert	MINA	84864	MYC induced nuclear antigen
Herunterreguliert	MMP20	9313	matrix metalloproteinase 20
Herunterreguliert	MN1	4330	meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
Herunterreguliert	NAA10	8260	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit
Herunterreguliert	NAA15	80155	N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit
Herunterreguliert	NAA25	80018	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit
Herunterreguliert	NARG2	79664	NMDA receptor regulated 2
Herunterreguliert	NME2	4831	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2
Herunterreguliert	NSMAF	8439	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor
Herunterreguliert	OAF	220323	OAF homolog (Drosophila)
Herunterreguliert	OTUD6B	51633	OTU domain containing 6B
Herunterreguliert	PANX2	56666	pannexin 2
Herunterreguliert	PIGA	5277	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class A
Herunterreguliert	PIK3R6	146850	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 6
Herunterreguliert	PKP4	8502	plakophilin 4
Herunterreguliert	PLD6	201164	phospholipase D family, member 6
Herunterreguliert	POLD2P1	391811	polymerase (DNA directed), delta 2, accessory subunit pseudogene 1
Herunterreguliert	POLG2	11232	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit
Herunterreguliert	PP7080	25845	uncharacterized LOC25845
Herunterreguliert	PPAN	56342	peter pan homolog (Drosophila)
Herunterreguliert	PTMA	5757	prothymosin, alpha
Herunterreguliert	PTMAP8	728873	prothymosin, alpha pseudogene 8
Herunterreguliert	PUS1	80324	pseudouridylate synthase 1
Herunterreguliert	RIOK1	83732	RIO kinase 1 (yeast)
Herunterreguliert	RPS6KA5	9252	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
Herunterreguliert	S100A9	6280	S100 calcium binding protein A9
Herunterreguliert	SLC16A7	9194	solute carrier family 16, member 7 (monocarboxylic acid transporter 2)
Herunterreguliert	SLC19A3	80704	solute carrier family 19, member 3
Herunterreguliert	SLC25A39	51629	solute carrier family 25, member 39
Herunterreguliert	SLC37A3	84255	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3
Herunterreguliert	SLC45A3	85414	solute carrier family 45, member 3
Herunterreguliert	SLC4A7	9497	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
Herunterreguliert	SNAPC5	10302	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 5, 19kDa
Herunterreguliert	SNORD31	9298	small nucleolar RNA, C/D box 31
Herunterreguliert	SNORD6	692075	small nucleolar RNA, C/D box 6
Herunterreguliert	SNX5	27131	sorting nexin 5
Herunterreguliert	SPIN1	10927	spindlin 1
Herunterreguliert	STK39	27347	serine threonine kinase 39
Herunterreguliert	STRBP	55342	spermatid perinuclear RNA binding protein

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Herunterreguliert	SYN1	6853	synapsin I
Herunterreguliert	TEAD4	7004	TEA domain family member 4
Herunterreguliert	TEX19	400629	testis expressed 19
Herunterreguliert	TMEM241	85019	transmembrane protein 241
Herunterreguliert	TMEM48	55706	transmembrane protein 48
Herunterreguliert	TMTC3	160418	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3
Herunterreguliert	TOMM40	10452	translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)
Herunterreguliert	TP63	8626	tumor protein p63
Herunterreguliert	TRIM61	391712	tripartite motif containing 61
Herunterreguliert	TRMT6	51605	tRNA methyltransferase 6 homolog (S. cerevisiae)
Herunterreguliert	TSKU	25987	tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog (Xenopus laevis)
Herunterreguliert	TYRO3	7301	TYRO3 protein tyrosine kinase
Herunterreguliert	TYSND1	219743	trypsin domain containing 1
Herunterreguliert	UTP15	84135	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)
Herunterreguliert	WDR77	79084	WD repeat domain 77
Herunterreguliert	WSB2	55884	WD repeat and SOCS box containing 2
Herunterreguliert	YAF2	10138	YY1 associated factor 2
Herunterreguliert	ZNF138	7697	zinc finger protein 138
Herunterreguliert	ZNF239	8187	zinc finger protein 239
Herunterreguliert	ZNF324B	388569	zinc finger protein 324B
Herunterreguliert	ZNF74	7625	zinc finger protein 74
Hochreguliert	ACAP1	9744	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1
Hochreguliert	ADC	113451	arginine decarboxylase
Hochreguliert	AGT	183	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Hochreguliert	AGXT2L2	85007	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 2
Hochreguliert	AIF1L	83543	allograft inflammatory factor 1-like
Hochreguliert	AIM1	202	absent in melanoma 1
Hochreguliert	ANKRD50	57182	ankyrin repeat domain 50
Hochreguliert	ANPEP	290	alanyl (membrane) aminopeptidase
Hochreguliert	ANXA1	301	annexin A1
Hochreguliert	ANXA2R	389289	annexin A2 receptor
Hochreguliert	APOL3	80833	apolipoprotein L, 3
Hochreguliert	ARHGAP9	64333	Rho GTPase activating protein 9
Hochreguliert	ARHGEF3	50650	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3
Hochreguliert	ARHGEF6	9459	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
Hochreguliert	ASAH2C	653365	N-acylsphingosine amidohydrolase (non-lysosomal ceramidase) 2C
Hochreguliert	ATM	472	ataxia telangiectasia mutated
Hochreguliert	ATP2B4	493	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4
Hochreguliert	BATF	10538	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
Hochreguliert	BTN2A1	11120	butyrophilin, subfamily 2, member A1
Hochreguliert	C15orf48	84419	chromosome 15 open reading frame 48
Hochreguliert	C1orf54	79630	chromosome 1 open reading frame 54
Hochreguliert	C5orf62	85027	chromosome 5 open reading frame 62
Hochreguliert	CACNA2D3	55799	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3
Hochreguliert	CCM2	83605	cerebral cavernous malformation 2
Hochreguliert	CD300C	10871	CD300c molecule

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Hochreguliert	CD82	3732	CD82 molecule
Hochreguliert	CDKN1A	1026	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
Hochreguliert	CDKN2D	1032	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
Hochreguliert	CELF2	10659	CUGBP, Elav-like family member 2
Hochreguliert	CFLAR	8837	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
Hochreguliert	CHODL	140578	chondrolectin
Hochreguliert	CHRN1B	1140	cholinergic receptor, nicotinic, beta 1 (muscle)
Hochreguliert	CHSY1	22856	chondroitin sulfate synthase 1
Hochreguliert	CITED2	10370	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
Hochreguliert	CMTM3	123920	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
Hochreguliert	CMTM6	54918	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6
Hochreguliert	COL9A2	1298	collagen, type IX, alpha 2
Hochreguliert	CSMD2	114784	CUB and Sushi multiple domains 2
Hochreguliert	CST7	8530	cystatin F (leukocystatin)
Hochreguliert	CTSB	1508	cathepsin B
Hochreguliert	CTSH	1512	cathepsin H
Hochreguliert	CYTH4	27128	cytohesin 4
Hochreguliert	DCUN1D3	123879	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 3 (S. cerevisiae)
Hochreguliert	DEXI	28955	Dexi homolog (mouse)
Hochreguliert	DLGAP4	22839	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4
Hochreguliert	DVL3	1857	dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)
Hochreguliert	EHBP1L1	254102	EH domain binding protein 1-like 1
Hochreguliert	ENPP1	5167	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
Hochreguliert	EVI2B	2124	ecotropic viral integration site 2B
Hochreguliert	FAM129A	116496	family with sequence similarity 129, member A
Hochreguliert	FAM179A	165186	family with sequence similarity 179, member A
Hochreguliert	FAM214B	80256	family with sequence similarity 214, member B
Hochreguliert	FAM46A	55603	family with sequence similarity 46, member A
Hochreguliert	FAM89B	23625	family with sequence similarity 89, member B
Hochreguliert	FAS	355	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
Hochreguliert	FES	2242	feline sarcoma oncogene
Hochreguliert	FGF9	2254	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
Hochreguliert	FTH1P2	2497	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 2
Hochreguliert	FTH1P20	729009	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 20
Hochreguliert	FTH1P3	2498	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 3
Hochreguliert	FTH1P8	2501	ferritin, heavy polypeptide 1 pseudogene 8
Hochreguliert	FURIN	5045	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
Hochreguliert	GAB3	139716	GRB2-associated binding protein 3
Hochreguliert	GADD45A	1647	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
Hochreguliert	GALNT10	55568	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide
Hochreguliert	GBP1	2633	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
Hochreguliert	GBP1P1	400759	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1
Hochreguliert	GPSM3	63940	G-protein signaling modulator 3
Hochreguliert	GVINP1	387751	GTPase, very large interferon inducible pseudogene 1
Hochreguliert	GYG1	2992	glycogenin 1
Hochreguliert	GZMB	3002	granzyme B

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Hochreguliert	HCST	10870	hematopoietic cell signal transducer
Hochreguliert	HDAC4	9759	histone deacetylase 4
Hochreguliert	HIST1H1C	3006	histone cluster 1, H1c
Hochreguliert	HIST1H2AC	8334	histone cluster 1, H2ac
Hochreguliert	HIST1H2AG	8969	histone cluster 1, H2ag
Hochreguliert	HIST1H2BD	3017	histone cluster 1, H2bd
Hochreguliert	HIST1H2BK	85236	histone cluster 1, H2bk
Hochreguliert	HIST1H4H	8365	histone cluster 1, H4h
Hochreguliert	HIST2H2AA3	8337	histone cluster 2, H2aa3
Hochreguliert	HIST2H2AA4	723790	histone cluster 2, H2aa4
Hochreguliert	HIST2H2BE	8349	histone cluster 2, H2be
Hochreguliert	HIST2H4A	8370	histone cluster 2, H4a
Hochreguliert	HMOX2	3163	heme oxygenase (decycling) 2
Hochreguliert	ID2	3398	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Hochreguliert	IFI44	10561	interferon-induced protein 44
Hochreguliert	IL1RN	3557	interleukin 1 receptor antagonist
Hochreguliert	IL26	55801	interleukin 26
Hochreguliert	IL4I1	259307	interleukin 4 induced 1
Hochreguliert	IL4R	3566	interleukin 4 receptor
Hochreguliert	IL7R	3575	interleukin 7 receptor
Hochreguliert	IQGAP1	8826	IQ motif containing GTPase activating protein 1
Hochreguliert	ITGAV	3685	integrin, alpha V
Hochreguliert	ITM2B	9445	integral membrane protein 2B
Hochreguliert	ITPR1	3708	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1
Hochreguliert	ITPRIP	85450	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein
Hochreguliert	KIAA0226L	80183	KIAA0226-like
Hochreguliert	KIAA0247	9766	KIAA0247
Hochreguliert	KIAA1217	56243	KIAA1217
Hochreguliert	KIR2DL1	3802	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 1
Hochreguliert	KIR2DL3	3804	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 3
Hochreguliert	KIR2DL4	3805	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 4
Hochreguliert	KIR2DL5A	57292	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 5A
Hochreguliert	KIR2DS5	3810	killer cell immunoglobulin-like receptor, short cytoplasmic tail, 5
Hochreguliert	KIR3DL1	3811	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 1
Hochreguliert	KIR3DL2	3812	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 2
Hochreguliert	KIR3DL3	115653	killer cell immunoglobulin-like receptor, long cytoplasmic tail, 3
Hochreguliert	KLF13	51621	Kruppel-like factor 13
Hochreguliert	LAPTM5	7805	lysosomal protein transmembrane 5
Hochreguliert	LAT2	7462	linker for activation of T cells family, member 2
Hochreguliert	LGALS1	3956	lectin, galactoside-binding, soluble, 1
Hochreguliert	LGALS3	3958	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
Hochreguliert	LINC00260	84719	long intergenic non-protein coding RNA 260
Hochreguliert	LINC00294	283267	long intergenic non-protein coding RNA 294
Hochreguliert	LINC00341	79686	long intergenic non-protein coding RNA 341
Hochreguliert	LOC286453	286453	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 pseudogene
Hochreguliert	LOC550643	550643	uncharacterized LOC550643

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Hochreguliert	MAML2	84441	mastermind-like 2 (Drosophila)
Hochreguliert	MEF2D	4209	myocyte enhancer factor 2D
Hochreguliert	METRNL	284207	meteorin, glial cell differentiation regulator-like
Hochreguliert	MIAT	440823	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)
Hochreguliert	MOAP1	64112	modulator of apoptosis 1
Hochreguliert	MTMR11	10903	myotubularin related protein 11
Hochreguliert	MTMR7	9108	myotubularin related protein 7
Hochreguliert	MXD1	4084	MAX dimerization protein 1
Hochreguliert	MYO1F	4542	myosin IF
Hochreguliert	NFKBIZ	64332	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
Hochreguliert	NLRP7	199713	NLR family, pyrin domain containing 7
Hochreguliert	NMRK1	54981	nicotinamide riboside kinase 1
Hochreguliert	NUB1	51667	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1
Hochreguliert	NUCB2	4925	nucleobindin 2
Hochreguliert	OAS3	4940	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa
Hochreguliert	ORAI3	93129	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3
Hochreguliert	OSTF1	26578	osteoclast stimulating factor 1
Hochreguliert	PBX4	80714	pre-B-cell leukemia homeobox 4
Hochreguliert	PBXIP1	57326	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1
Hochreguliert	PCMTD1	115294	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase domain containing 1
Hochreguliert	PHLDA1	22822	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
Hochreguliert	PIK3CG	5294	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma
Hochreguliert	PLXNC1	10154	plexin C1
Hochreguliert	POU3F2	5454	POU class 3 homeobox 2
Hochreguliert	PPP1R18	170954	protein phosphatase 1, regulatory subunit 18
Hochreguliert	PPP1R27	116729	protein phosphatase 1, regulatory subunit 27
Hochreguliert	PRDM8	56978	PR domain containing 8
Hochreguliert	PRF1	5551	perforin 1 (pore forming protein)
Hochreguliert	PTPN22	26191	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
Hochreguliert	PXN	5829	paxillin
Hochreguliert	RAB32	10981	RAB32, member RAS oncogene family
Hochreguliert	RAB8B	51762	RAB8B, member RAS oncogene family
Hochreguliert	RAC2	5880	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (Rac2)
Hochreguliert	RASD1	51655	RAS, dexamethasone-induced 1
Hochreguliert	RASL11B	65997	RAS-like, family 11, member B
Hochreguliert	RELA	5970	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Hochreguliert	RHOC	389	ras homolog family member C
Hochreguliert	RHOU	58480	ras homolog family member U
Hochreguliert	RNASEL	6041	ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent)
Hochreguliert	RNF114	55905	ring finger protein 114
Hochreguliert	RRN3P1	730092	RNA polymerase I transcription factor homolog pseudogene 1
Hochreguliert	RTP4	64108	receptor (chemosensory) transporter protein 4
Hochreguliert	S100P	6286	S100 calcium binding protein P
Hochreguliert	SAMD9L	219285	sterile alpha motif domain containing 9-like
Hochreguliert	SATB1	6304	SATB homeobox 1
Hochreguliert	SBNO2	22904	strawberry notch homolog 2 (Drosophila)

Genstatus	Gen-Symbol	Gen-ID	Genbeschreibung
Hochreguliert	SERPINA1	5265	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin)
Hochreguliert	SH2D2A	9047	SH2 domain containing 2A
Hochreguliert	SH3BGRL3	83442	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3
Hochreguliert	SH3BP2	6452	SH3-domain binding protein 2
Hochreguliert	SH3TC1	54436	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1
Hochreguliert	SLC9A9	285195	solute carrier family 9, subfamily A member 9
Hochreguliert	SLFN12	55106	schlafen family member 12
Hochreguliert	SMOX	54498	spermine oxidase
Hochreguliert	SNTB1	6641	syntrophin, beta 1
Hochreguliert	SPTLC2	9517	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2
Hochreguliert	SRGN	5552	serglycin
Hochreguliert	STXBP2	6813	syntaxin binding protein 2
Hochreguliert	SURF4	6836	surfeit 4
Hochreguliert	TBC1D2B	23102	TBC1 domain family, member 2B
Hochreguliert	TCN2	6948	transcobalamin II
Hochreguliert	TLR6	10333	toll-like receptor 6
Hochreguliert	TMEM140	55281	transmembrane protein 140
Hochreguliert	TMEM173	340061	transmembrane protein 173
Hochreguliert	TMEM217	221468	transmembrane protein 217
Hochreguliert	TNFRSF1A	7132	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
Hochreguliert	TNFRSF1B	7133	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
Hochreguliert	TNFSF10	8743	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
Hochreguliert	TNIK	23043	TRAF2 and NCK interacting kinase
Hochreguliert	TOX2	84969	TOX high mobility group box family member 2
Hochreguliert	TPST2	8459	tyrosylprotein sulfotransferase 2
Hochreguliert	TRANK1	9881	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1
Hochreguliert	TRIM9	114088	tripartite motif containing 9
Hochreguliert	TWIST1	7291	twist homolog 1 (Drosophila)
Hochreguliert	UCN2	90226	urocortin 2
Hochreguliert	VAV1	7409	vav 1 guanine nucleotide exchange factor
Hochreguliert	VIM	7431	vimentin
Hochreguliert	WASF2	10163	WAS protein family, member 2
Hochreguliert	WBP1L	54838	WW domain binding protein 1-like
Hochreguliert	YPEL5	51646	yippee-like 5 (Drosophila)
Hochreguliert	ZEB2	9839	zinc finger E-box binding homeobox 2

Tabelle 7: Signifikant deregulierte Gensignaturen nach *IRF4* Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien

Herunterregulierte Signaturen:				
Signaturname	Genanzahl	Enrichmentscore	P - Wert	FDR
Myc_overexpression_1.5x_up	88	0,7593	0,0010	0,0010
Myc_overexpression_2x_up	36	0,7321	0,0010	0,0010
HIF1alpha_1.5x_down	215	0,6504	0,0010	0,0010
Myc_RNAi_OCILy3	54	0,6451	0,0010	0,0010
Proliferation_Node1640	56	0,6024	0,0010	0,0010
Notch_T-ALL_up_Palomero	47	0,5991	0,0010	0,0010
MCL_proliferation_survival	17	0,5908	0,0592	0,0296
Myc_ChIP_PET_Expr_Up	405	0,5738	0,0010	0,0010
HIF1alpha_2x_down	41	0,5664	0,0024	0,0012
Glutamine_starve_down	313	0,5638	0,0010	0,0009
Notch_T-ALL_up_Sharma	37	0,5462	0,0089	0,0022
CD8_T_effectorDn_memoryDn_NaiveUp	14	0,5248	0,2204	0,1102
Erythrocytic_Node1660	14	0,5230	0,1354	0,2472
Myeloma_PR_subgroup_up	49	0,5137	0,0104	0,0441
Leucine_starve_down	178	0,5088	0,0010	0,0010

Hochregulierte Signaturen:				
Signaturname	Genanzahl	Enrichmentscore	P - Wert	FDR
Quiescence_heme_cluster3	12	-0,7423	0,0133	0,0044
Hematopoietic_Node1658	84	-0,6492	0,0010	0,0010
Notch_T-ALL_down_Sharma	18	-0,6184	0,0311	0,0236
Quiescence_heme_cluster1	151	-0,6157	0,0010	0,0010
BreastCa_70gene_Good	13	-0,6072	0,0693	0,0208
T_NK_Node1604	20	-0,5975	0,0261	0,0500
NK_U133plus	33	-0,5915	0,0031	0,0190
IFN_PMBC_4x_Up	82	-0,5697	0,0010	0,0010
TGFbeta_down_epithelial_large	20	-0,5670	0,0643	0,0193
Regulatory_T_cell_McHugh_Herman_concensus	19	-0,5664	0,0915	0,0292
T_NK_Node5808	20	-0,5660	0,0491	0,0721
CNSonly_Node1460	18	-0,5621	0,0790	0,0406
Quiescence_heme_all	272	-0,5545	0,0010	0,0010
T_cell	15	-0,5515	0,1691	0,0154
KLF2_induced	106	-0,5442	0,0010	0,0010
NFkB_Up_BCR_paper	68	-0,5324	0,0010	0,0010
Myeloma_LB_subgroup_down	45	-0,5310	0,0085	0,0155
Splenic_Marginal_zone_Bcell_gt_naive_and_GC_Bcell	24	-0,5280	0,0775	0,0182
Tcell_cytokine_induced_PMBConly_linduced	42	-0,5274	0,0108	0,0281
STAT3_up_OCILy10	42	-0,5234	0,0106	0,0151
STAT3_up_OCILy10	42	-0,5234	0,0095	0,0032
Myeloma_CD-2_subgroup_up	47	-0,5233	0,0040	0,0359
Resting_blood_NK_cell_GNF	71	-0,5212	0,0017	0,0175

Tabelle 8: Signifikant deregulierte Gensignaturen nach *IRF4* Herunterregulation bei ALCL-Zelllinien aus *Molecular Signatures Database*

Herunterregulierte Signaturen Signaturname	Genanzahl	Enrichmentscore	P - Wert
Myc_overexpression_1.5x_up	86	0,7593	0,0010
SCHUHMACHER_MYC_TARGETS_UP	80	0,7030	0,0010
SCHLOSSER_MYC_AND_SERUM_RESPONSE_SYNERGY	32	0,6621	0,0010
Myc_RNAi_OCILy3	54	0,6451	0,0010
COLLER_MYC_TARGETS_UP	25	0,6240	0,0061
MENSSEN_MYC_TARGETS	53	0,6022	0,0010
Myc_ChIP_PET_Expr_Up	405	0,5738	0,0010
ACOSTA_PROLIFERATION_INDEPENDENT_MYC_TARGETS_UP	84	0,5366	0,0010